



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

***“BASES MOLECULARES DE LA NEURODEGENERACIÓN EN
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER:
PAPEL DE P86L-CALHM1 Y
BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS”***

Memoria que presenta **Dña. Ana José Moreno Ortega** para optar al Grado de
Doctor

Directoras:

Dra. María Francisca Cano Abad

Dra. Manuela García López

Trabajo realizado en el Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento
Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina
Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de La Princesa
Madrid, 2014

**ABSTRACT/
RESUMEN**

ABSTRACT

Due to the progress of the industrialised societies, diseases related to aging, such as Alzheimer's disease (AD), have greatly increased and have become a social, healthcare and economical problem. The fight against dementia has led to the investment of billions of dollars in myriads of basic and clinical investigations. At present, it is believed that genetic and environmental factors could lead to suffer from AD; however, we still do not know the etiopathogenesis of AD nor do we completely understand the mechanisms of neurodegeneration of a selective neuronal population. Therefore, we not only lack of effective drugs to stop or, at least, slow down the neuronal loss, but we also ignore which are the therapeutic targets. That is why new points of view on the pathological mechanisms of AD are required.

After decades of research, we know that during the progression of AD, neurodegeneration appears in entorhinal cortex; from there, it spreads out to limbic areas and then it develops in the whole isocortex. Neurodegeneration begins within the cholinergic neurons, which are the most vulnerable in this illness; although, as the disease advances, other neurotransmission systems like the glutamatergic, dopaminergic and serotonergic are also affected.

Neurodegeneration in AD is due to a non-well understood complex process in which Ca^{2+} dyshomeostasis, mitochondrial dysfunctions, oxidative stress, amyloid β ($\text{A}\beta$) aggregation, tau protein hyperphosphorylation, synaptic loss and neuroinflammation are involved. Cholinergic, amyloid and Ca^{2+} dyshomeostasis theories define each of these mechanisms as possible causes of AD; however, the exact role of each pathological mechanism is still controversial.

In this Thesis, we have focused on the polymorphism P86L of the new Ca^{2+} channel CALHM1 (P86L-CALHM1), which has been related, in some populations of patients, to AD. P86L-CALHM1 has shown to alter Ca^{2+} homeostasis and to induce an accumulation of the more toxic species of $\text{A}\beta$. Here, we have aimed to explore how P86L-CALHM1 affects intracellular Ca^{2+} homeostasis and whether this mutation can make cells more vulnerable to toxic stimulus related to AD. Furthermore, we have tried to search for drugs able to modulate CALHM1 (as a pharmacological tool) and P86L-CALHM1 (to mitigate the effect of the mutation).

Focusing on the location of CALHM1 and P86L-CALHM1, we have confirmed that CALHM1 and P86L-CALHM1 are distributed in plasma membrane and endoplasmic reticulum (ER). In cells expressing CALHM1 or P86L-CALHM1, we have explored Ca^{2+} homeostasis in various organelles, namely cytosol, mitochondria, ER and nucleus. In all cases, the add-back Ca^{2+} protocol activated the Ca^{2+} channel CALHM1 generating a patent Ca^{2+} signal; however, this signal was smaller and sustained in P86L-CALHM1-expressing cells.

We have also set up a drug screening protocol in order to find a modulator of the CALHM1 Ca^{2+} channel. For the first time, we have found that the organic compound CGP37157 is able to block selectively, at low concentrations, this channel. However, we have failed in mitigating the effect of the P86L mutation on Ca^{2+} homeostasis.

Finally, we have shown that P86L-CALHM1 confers greater vulnerability towards AD-related toxic stimulus, namely okadaic acid and $\text{A}\beta$, in contrast to other insults. This vulnerability leads cells to die by an apoptotic mechanism due to the fact that the expression of P86L-CALHM1 together with $\text{A}\beta$ exposure, reduces not only the expression, but also the activation of "pro-survival" proteins, such as ERK1/2 or CREB.

As a global conclusion, P86L-CALHM1 alters Ca^{2+} homeostasis and, when in the presence of $\text{A}\beta$, it increases vulnerability towards apoptotic cell death.

RESUMEN

Debido al progreso de las sociedades industrializadas, las patologías relacionadas con el envejecimiento, como la enfermedad de Alzheimer (EA), se han visto incrementadas, convirtiéndose en un problema socio-sanitario y económico. La lucha contra la demencia nos ha llevado a gastar millones de euros en miles de investigaciones básicas y clínicas. En la actualidad, se cree que diversos factores genéticos y ambientales conllevan al establecimiento de la EA; sin embargo, seguimos sin saber su etiopatogenia y sin entender los mecanismos de neurodegeneración de ciertas poblaciones neuronales. Por tanto, no solo carecemos de fármacos efectivos que frenen o, al menos, retrasen la pérdida neuronal, sino que también ignoramos cuáles son las dianas terapéuticas a tratar. Es por ello por lo que se precisan nuevas ideas acerca de los mecanismos patológicos en la EA.

Tras décadas de investigaciones, solo sabemos que durante la evolución de la EA, la neurodegeneración aparece en el córtex entorrinal, desde donde se expande hacia áreas límbicas y, posteriormente, al isocórtex. La muerte celular comienza en las neuronas colinérgicas, las cuales conforman la población neuronal más vulnerable de esta patología, aunque según avanza la enfermedad, otros sistemas de neurotransmisión se encuentran afectados, como el glutamatérgico, el dopaminérgico o el serotoninérgico.

La pérdida de las neuronas en la EA es debido a un proceso complejo y no bien entendido, que incluye dishomeostasia del Ca^{2+} , alteraciones mitocondriales y estrés oxidativo, agregación del péptido β -amiloide (βA), hiperfosforilación de la proteína tau, pérdida sináptica y neuroinflamación. Las teorías colinérgica, amiloidea o la basada en la dishomeostasia del Ca^{2+} hacen responsables de la EA a estos procesos; sin embargo, aun es controvertido el papel fisiológico que posee cada mecanismo patológico.

En esta Tesis, hemos fijado nuestra atención en el polimorfismo P86L del nuevo canal de Ca^{2+} CALHM1 (P86L-CALHM1), el cual ha sido relacionado epidemiológicamente con la EA. Está demostrado que P86L-CALHM1 altera la

homeostasia del Ca^{2+} y promueve la acumulación de las especies más tóxicas del βA . Nuestro objetivo fue explorar cómo P86L-CALHM1 altera la homeostasia del Ca^{2+} intracelular y si esta mutación hacía a las células más vulnerables frente a estímulos tóxicos relacionados con la EA. Además, hemos intentado buscar fármacos moduladores tanto de CALHM1 (como herramienta farmacológica), como de P86L-CALHM1 (con el fin de mitigar el efecto de la mutación).

Centrándonos en la localización de CALHM1 y P86L-CALHM1, hemos confirmado que se distribuyen en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico (RE). Posteriormente, hemos analizado la homeostasia del Ca^{2+} en varias organelas (citósol, mitocondria, RE y núcleo) en presencia de CALHM1 o P86L-CALHM1. En todos los casos, los protocolos de reintroducción de Ca^{2+} activaron al canal de Ca^{2+} CALHM1, generando una clara señal de Ca^{2+} ; sin embargo, la señal fue más pequeña y sostenida en el tiempo en las células que expresaban P86L-CALHM1.

Por otra parte, hemos realizado un cribado farmacológico para tratar de hallar un modulador del canal de Ca^{2+} . Por primera vez, hemos descrito un compuesto orgánico capaz de bloquear selectivamente a muy bajas concentraciones (en el rango de micromolar) la forma nativa del canal CALHM1: el CGP37157. No obstante, hemos fracasado en el intento de mitigar el efecto de la mutación P86L-CALHM1 sobre la homeostasia del Ca^{2+} .

Finalmente, hemos demostrado que P86L-CALHM1 confiere a las células una mayor vulnerabilidad hacia estímulos tóxicos relacionados con la EA, tales como el ácido okadaico o el βA , en contraste con otros venenos. Esta vulnerabilidad conlleva a la muerte celular mediante la activación de la ruta apoptótica, puesto que la expresión de P86L-CALHM1, junto a la exposición del βA , reduce no solo la expresión, sino también la activación de proteínas "pro-vida", tales como ERK1/2 o CREB.

Como conclusión, P86L-CALHM1 altera la homeostasia del Ca^{2+} y, en presencia de βA , incrementa la vulnerabilidad celular hacia la muerte apoptótica.

ÍNDICE

1. Abreviaturas y acrónimos más empleados.....	1
2. Marco de la Tesis Doctoral.....	4
3. Justificación del estudio.....	6
4. Introducción	
4.1 La enfermedad de Alzheimer.....	9
4.2 Mecanismos de neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer.....	12
4.2.1 Agregación proteica.....	13
4.2.1.a Placas seniles.....	13
4.2.1.b Angiopatía amiloidea.....	19
4.2.1.c Ovillos neurofibrilares.....	20
4.2.1.d Cuerpos de Hirano.....	21
4.2.2 Disfunciones mitocondriales.....	21
4.2.3 Dishomeostasia del Ca^{2+}	23
4.2.4 Degeneración neuronal	
4.2.4.a Degenereación gránulo-vacuolar.....	27
4.2.4.b Pérdida sináptica.....	27
4.2.4.c Vulnerabilidad colinérgica.....	28
4.2.5 Neuroinflamación.....	30
4.3 Otros factores relacionados con la enfermedad de Alzheimer.....	32
4.4 Clínica y terapéutica de la enfermedad de Alzheimer.....	35
4.4.1 Fármacos colinérgicos.....	37

4.4.2	Bloqueantes de la excitotoxicidad.....	38
4.5	P86L-CAHM1: Un nuevo agente implicado en la etiopatogenia de la enfermedad de Alzheimer.....	39
4.5.1	Estructura de CALHM1.....	40
4.5.2	Propiedades eléctricas y de permeabilidad de CALHM1.....	42
4.5.3	Papel fisiológico de CALHM1.....	47
4.5.4	Farmacología del canal CALHM1.....	48
4.5.5	El polimorfismo P86L-CALHM1 y su implicación en la enfermedad de Alzheimer.....	51
5.	Hipótesis de trabajo.....	53
6.	Objetivos.....	55
7.	Materiales y métodos.....	57
7.1	Líneas celulares.....	58
7.1.1	Línea celular de carcinoma de endometrio humano HeLa.....	58
7.1.2	Línea celular de neuronas de hipocampo de ratón HT22.....	59
7.1.3	Línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.....	60
7.2	Mantenimiento de los cultivos celulares.....	62
7.3	Medidas de Ca^{2+} a nivel subcelular mediante la proteína bioluminiscente ecurina.....	64
7.3.1	Fundamento de la técnica.....	65
7.3.2	Procedimiento experimental.....	69
7.3.3	Moduladores farmacológicos empleados.....	73
7.4	Determinación de las variaciones de Ca^{2+} mitocondrial mediante el Pericam mitocondrial.....	73
7.4.1	Fundamento de la técnica.....	74
7.4.2	Procedimiento experimental.....	74
7.5	Medida del pH de la matriz mitocondrial mediante la sonda fluorescente AlpHi.....	75
7.5.1	Fundamento de la técnica.....	75
7.5.2	Procedimiento experimental.....	76

7.6	Visualización de la apertura del mPTP con la técnica de calceína- Co²⁺	76
7.6.1	Fundamento de la técnica	76
7.6.2	Procedimiento experimental	77
7.7	Cuantificación de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT	77
7.7.1	Fundamento de la técnica	78
7.7.2	Procedimiento experimental	78
7.7.3	Estímulos tóxicos empleados	79
7.8	Estudio de la muerte celular por apoptosis	80
7.8.1	Estudio del ciclo celular mediante tinción de cromatina con ioduro de propidio	80
7.8.1.1	Fundamento de la técnica	80
7.8.1.2	Procedimiento experimental	81
7.8.2	Estudio de las distintas fases de la apoptosis mediante citometría de flujo	82
7.8.2.1	Fundamento de la técnica	83
7.8.2.2	Procedimiento experimental	83
7.8.3	Medida de las caspasas-3/-7	85
7.8.3.1	Fundamento de la técnica	85
7.8.3.2	Procedimiento experimental	85
7.9	Determinación de la expresión de proteínas mediante "western blot"	86
7.9.1	Fundamento de la técnica	86
7.9.2	Procedimiento experimental	86
7.10	Exploración de la localización de proteínas y organelas mediante microscopía confocal	88
7.10.1	Fundamento de la técnica	88
7.10.2	Procedimiento experimental	88
7.11	Análisis estadístico	90
8.	Resultados	91
8.1	Expresión y localización de CALHM1	92

8.1.1	Las células HeLa se transfectan eficazmente con CALHM1/P86L-CALHM1.....	92
8.1.2	CALHM1/P86L-CALHM1 se localizan fundamentalmente en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico.....	94
8.2	CALHM1 y P86L-CALHM1 generan distintas señales intracelulares de Ca^{2+}	100
8.2.1	Señales de Ca^{2+} citosólico mediadas por CALHM1 y P86L-CALHM1.....	100
8.2.2	Señales de Ca^{2+} mitocondrial inducidas por CALHM1/P86L-CALHM1.....	102
8.2.3	Homeostasia del Ca^{2+} mitocondrial mediante la liberación de Ca^{2+} reticular en presnecia de CALHM1/P86L-CALHM1.....	104
8.2.4	Señales de Ca^{2+} nuclear en presencia de CALHM1/P86L-CALHM1.....	105
8.3	Búsqueda de moduladores de las señales de Ca^{2+} inducidas por CALHM1 y P86L-CALHM1	109
8.3.1	Utilización de compuestos bloqueantes de canales de Ca^{2+}	
8.3.1.1	Co^{2+}	109
8.3.1.2	Fluconazol.....	110
8.3.1.3	ITH12233.....	112
8.3.2	Utilización de fármacos moduladores de la homeostasia del Ca^{2+} mitocondrial	
8.3.2.1	Dimebona.....	114
8.3.2.2	CGP37157.....	117
8.3.2.3	ITH12575.....	121
8.3.3	Efecto del péptido β -amiloide sobre la señal de Ca^{2+} mediada a través de CALHM1.....	123
8.4	Estudio de la vulnerabilidad celular ante a diversos estímulos tóxicos inducida por P86L-CALHM1	127
8.4.1	Efectos de P86L-CALHM1 sobre la viabilidad celular ante diversos tóxicos, estudiados mediante MTT.....	127

8.4.2	Análisis de la activación de apoptosis frente a diversos tóxicos en células HeLa que expresaban P86L-CALHM1.....	132
8.4.3	Estudio de la toxicidad de la combinación del péptido β -amiloide y P86L-CALHM1 en neuronas hipocampales.....	136
8.4.4	Determinación de las bases moleculares de la vulnerabilidad inducida por P86L-CALHM1 ante el péptido β -amiloide.....	139
9.	Discusión.....	140
10.	Conclusiones.....	158
11.	Referencias bibliográficas.....	161
12.	Anexos	
12.1	Anexo I: Listado completo de abreviaturas empleadas.....	202
12.2	Anexo II: Artículo original publicado por Alois Alzheimer donde describía su enfermedad epónima.....	208

1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS MÁS EMPLEADOS

(por orden de aparición, indicado con el subíndice)

¹ **EA**: Enfermedad de Alzheimer

³ **P86L-CALHM1**: Polimorfismo del canal "CALcium Homeostasis Modulator 1", consistente en la sustitución de una Prolina por una Leucina en el codón 86

⁵ **βA**: Péptido β-amiloide

⁶ **βA₁₋₄₀**: Péptido β-amiloide formado por 40 aminoácidos

⁷ **βA₁₋₄₂**: Péptido β-amiloide formado por 42 aminoácidos

⁹ **APP**: Proteína precursora del péptido β-amiloide

¹⁸ **RE**: Retículo endoplásmico

²⁸ **Caspasas**: Original acrónimo de cisteinil-aspartato proteasas

³⁴ **IP₃**: Inositol 1,4,5-trisfosfato

³⁷ **SERCA**: Acrónimo inglés "(sarco)-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase" que alude a la ATPasa de Ca²⁺ del retículo endoplásmico

³⁸ **PMCA**: Acrónimo inglés "plasma membrane Ca²⁺ ATPase" que alude a la bomba de Ca²⁺ de la membrana plasmática

³⁹ **mpNCX**: Intercambiador Na⁺/Ca²⁺ de la membrana plasmática

⁴¹ **mUP**: Acrónimo inglés "mitochondrial uniporter" que alude al uniportador mitocondrial de Ca²⁺

⁴² **mNCX**: Intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial

⁴³ **mPTP**: Del inglés "mitochondrial permeability transition pore", alude al poro mitocondrial de permeabilidad transitoria

⁴⁶ **MAMs**: Membranas asociadas a mitocondrias

⁴⁷ **[Ca²⁺]_{cit}**: Concentración citosólica de Ca²⁺

⁴⁸ **RIP_{3s}**: Receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato

⁴⁹ **RRi**: Receptores de rianodina

⁵⁰ **RL**: Radicales libres

⁵¹ **CALHM1**: Acrónimo inglés de "CALcium Homeostasis Modulator 1" que designa al modulador 1 de la homeostasia del Ca²⁺

⁶⁵ **TM**: Transmembranal (domino)

- ⁶⁶ **C. elegans**: Nematodo *Caenorhabditis elegans* (Maupas)
- ⁶⁷ **SH-SY5Y**: Línea celular de neuroblastoma humana
- ⁶⁸ **Xenopus**: Rana africana de uñas *Xenopus laevis* (Daudin)
- ⁶⁹ **GFP**: Acrónimo inglés "Green Fluorescent Protein" que define a la proteína fluorescente verde
- ⁷⁰ **CHLM-1**: Homólogo de CALHM1 en *C. elegans*
- ⁷¹ **CHO**: Acrónimo inglés de "Chinese Hamster Ovary" que designa a la línea celular no excitable procedente de ovario de hámster chino
- ⁷² **N2a**: Línea celular de neuroblastoma de ratón
- ⁷⁴ **[Ca²⁺]**: Concentración de Ca²⁺
- ⁷⁵ **HT22**: Línea celular de hipocampo de ratón
- ⁷⁶ **PC12**: Línea celular de feocromocitoma de rata
- ⁷⁷ **HEK-293**: Línea celular de riñón de embrión humano
- ⁷⁸ **HeLa**: Línea celular no excitable procedente de un carcinoma de cérvix de la Sra. Henrietta Lacks
- ⁷⁹ **CCDV**: Canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje
- ⁸³ **2-APB**: Borato de 2-aminoetoxidifenilo (del inglés "2-AminoethoxydiPhenyl Borate")
- ⁸⁷ **KO**: Knock out, ratón deleciónado para un gen
- ⁸⁹ **DMEM**: Del inglés ("Dulbecco's modified Eagle medium"), medio de Eagle modificado por Dulbecco
- ⁹⁰ **SBF**: Suero bovino fetal inmunológicamente inactivado por calor
- ⁹¹ **PBS**: Solución tampón fosfato
- ⁹² **EDTA**: Ácido etiléndiaminotetraacético
- ⁹³ **DMSO**: Dimetilsulfóxido
- ⁹⁵ **DAPI**: Dihidrocloreuro de 4',6-diamidino-2-fenilindol
- ⁹⁶ **[Ca²⁺]_{mit}**: Concentración de Ca²⁺ en la matriz mitocondrial
- ⁹⁷ **[Ca²⁺]_{nuc}**: Concentración de Ca²⁺ en el nucleoplasma
- ⁹⁸ **AEQ**: Ecuorina
- ¹⁰⁰ **ADNc**: ADN copia
- ¹⁰¹ **Apo-AEQ**: Apoecuorina
- ¹⁰² **COX VIII**: subunidad VIII de la citocromo C oxidasa
- ¹⁰³ **AEQ-mitmut**: ecuorina mutada dirigida genéticamente a la mitocondria

- ¹⁰⁴ **HEPES**: N-[2-hidroxietil]-piperacino-N'-[2-ácido etanosulfónico]
- ¹⁰⁵ **EGTA**: Ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
- ¹⁰⁶ **FCCP**: Carbonil cianida-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona
- ¹⁰⁷ **βA₂₅₋₃₅**: Fragmento tóxico 35-35 del péptido β-amiloide
- ¹⁰⁸ **cpGFP**: Proteína verde fluorescente con tecnología de permutación circular
- ¹⁰⁹ **mtAlpHi**: Indiciador del pH de la matriz mitocondrial (del inglés, "mitochondrial alkaline pH indicator")
- ¹¹⁰ **YFP**: proteína fluorescente amarilla
- ¹¹¹ **mtECFP**: Proteína fluorescente ciano dirigida a mitocondria
- ¹¹² **MTT**: Sal de metiltetrazolio
- ¹¹³ **PAO**: Óxido de fenilarsina
- ¹¹⁴ **IP**: yoduro de propidio
- ¹¹⁵ **Anexina V-FITC**: Anexina V acoplada a un fluoróforo verde
- ¹¹⁶ **Anti-p-ERK**: Anticuerpo contra la forma fosforilada de ERK
- ¹¹⁷ **Anti-t-ERK**: Anticuerpo contra ERK total
- ¹¹⁸ **Anti-p-CREB**: Anticuerpo contra la forma fosforilada de CREB
- ¹¹⁹ **Anti-t-CREB**: Anticuerpo contra CREB total
- ¹²⁰ **RE-GFP**: Proteína fluorescente verde dirigida a retículo endoplásmico
- ¹²¹ **mit-RFP**: Proteína fluorescente roja dirigida a mitocondria
- ¹²² **ANOVA**: Análisis de la varianza
- ¹²³ **ABC**: Área bajo la curva, concentración total de Ca²⁺ por unidad de tiempo
- ¹²⁴ **τ_{act}**: Constante de tiempo de activación
- ¹²⁵ **τ_{inact}**: Constante de tiempo de inactivación
- ¹²⁶ **ITH33**: ITH12233
- ¹²⁹ **UAF**: Unidades arbitrarias de fluorescencia
- ¹³⁰ **CREB**: Del inglés (cAMP-response element binding protein), proteína de respuesta a la unión del AMPc
- ¹³¹ **ERK**: Del inglés, "Extracellular Regulated Kinases", son las proteínas cinasas reguladas extracelularmente

2. MARCO DE LA TESIS DOCTORAL

2. MARCO DE LA TESIS DOCTORAL

El trabajo de esta Tesis Doctoral se encuadra dentro de la Línea de Investigación del Laboratorio 9 del Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento, donde desde hace una década se ocupa del entendimiento de la homeostasia del ion Ca^{2+} tanto en condiciones fisiológicas, como patológicas. En este contexto uno de sus objetivos fundamentales es la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y moléculas con propiedades neuroprotectoras y, por ende, potencial efecto terapéutico frente a diversas enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer.

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El rápido progreso de las sociedades durante los s. XX y XXI plantea nuevos desafíos que deben ser abordados minuciosamente: el desarrollo sostenible, la utilización de energías renovables, el buen (re)uso y reciclaje de las materias primas fósiles, la agricultura ecológica, el correcto almacenamiento de los desechos industriales y nucleares... Una de las consecuencias de este desarrollo es el incremento de la calidad de vida, lo cual conlleva a un cambio en la estructura demográfica de las sociedades, provocando el envejecimiento de las mismas. Ello trae consigo la necesidad de afrontar nuevos retos, entre los que destaca la aparición de patologías asociadas a la vejez, tales como las enfermedades neurodegenerativas, siendo la demencia la más prevalente.

La enfermedad de Alzheimer (EA¹) es la causa más frecuente de demencia, una dolencia de la cual se aquejan actualmente unos 35 millones de personas, cifra que se duplicará cada 20 años, elevándose hasta 65,7 millones en 2030 y 115,4 millones en 2050, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud; de hecho, el número total de nuevos casos de demencia en todo el mundo es de casi 7,7 millones, lo cual implica un nuevo caso cada 4 segundos (Saxena y Wortmann, 2012). En España, se calcula que un 7,5 % de la población mayor de 75 años padece demencia, lo cual supone más de 320.000 personas; de ellos, unas 240.000 personas sufren EA¹ (Virués-Ortega y col., 2011; Tola-Arribas y col., 2013) [según datos poblacionales de la Proyección de Población 2013 del Instituto Nacional de Estadística].

Este problema sociosanitario se ve agravado por la situación económica mundial en la que nos hallamos, puesto que se estima que el gasto anual de todos los casos de demencia es de 600.000 millones de dólares americanos, una cifra que dobla el presupuesto de otras patologías, como el cáncer (Prince y col., 2013).

¹ EA: Enfermedad de Alzheimer

La demencia senil es un estado patológico incurable e irreversible, asociado a procesos neurodegenerativos y caracterizado por una pérdida progresiva de la memoria, el desarrollo de alteraciones cognitivas, la aparición de dificultad en la comunicación, así como cambios de humor e incluso de personalidad. Los síntomas de la demencia se van agravando a lo largo de la evolución de la enfermedad, lo que dificulta el cuidado de los pacientes a nivel médico e institucional y, muy especialmente, a nivel familiar, situación que se da en el 72 % de los casos españoles (Alom y col., 2006; Saxena y Wortmann, 2012; Prince y col., 2013).

Pese a decenas de años de estudio e ingentes cantidades de dinero invertidas, carecemos de terapias efectivas para detener el proceso neurodegenerativo; por ello, la terapéutica actual está basada en paliar los síntomas de la demencia: por ejemplo, en el caso de la EA, se están utilizando terapéuticamente anticolinesterásicos y antagonistas del receptor de glutamato tipo NMDA² aunque con una eficacia limitada; estrategias no farmacológicas, basadas en el incremento de tareas ocupacionales, parecen ser incluso más eficaces (Kumar y col., 2014). Por otra parte, las investigaciones realizadas con multitud de modelos animales han aportado una valiosa información, aunque en ocasiones contradictoria, según el paradigma experimental empleado (Webster y col., 2014); ello explica, en parte, el fracaso en la búsqueda de moduladores de la demencia. El problema radica en que aún desconocemos la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas, tales como la EA; no hemos llegado a comprender el mecanismo que conlleva a la degeneración selectiva de neuronas y, por ende, carecemos tanto de una ventana, como de una diana terapéutica válida.

Con este estudio, pretendemos esclarecer el mecanismo de vulnerabilidad celular inducido por P86L-CALHM1³ y modular farmacológicamente uno de los mecanismos degenerativos que favorece la progresión de la EA.

² NMDA: N-Metil-D-Aspartato

³ P86L-CALHM1: Polimorfismo del canal "CALcium Homeostasis Modulator 1", consistente en la sustitución de una Prolina por una Leucina en el codón 86

4. INTRODUCCIÓN

4. INTRODUCCIÓN

4.1 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

El 3 de noviembre de 1906, durante la XXXVII Reunión de Psiquiatras del Sudoeste de Alemania en Tubinga, un psiquiatra clínico y forense y neuroanatomista, Alois Alzheimer (Fig. 1a), presentó la comunicación "Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde" (traducida del alemán, "Acerca de un proceso patológico peculiar grave de la corteza cerebral"), la cual fue publicada un año después (Alzheimer, 1907; Anexo II). En este trabajo, Alois Alzheimer describió la enfermedad padecida por la Sra. Auguste Detter, la cual mostró durante 4 años un cuadro de alteraciones del comportamiento, con delirios y alucinaciones, afectación en la cognición y problemas de memoria, hasta que falleció por una septicemia. El estudio histopatológico del cerebro fue llevado a cabo por sus colaboradores Perusini y Bonfiglio (en la Fig. 1b), bajo su estrecha supervisión, y en él se advirtieron, por primera vez, las características histopatológicas de la EA, a saber, atrofia de la corteza cerebral, placas seniles (Fig. 1f y g) y ovillos neurofibrilares (Fig. 1 f y h) (Alzheimer, 1907; Maurer y col., 1997; Graeber, 2003; Hippus y Neundörfer, 2003; Ezquerro, 2007).

En dicha reunión de psiquiatras, este informe no solo no gozó de reconocimiento científico, sino que fue tachado en las actas de la misma como "inapropiada para una ponencia breve", salvo para el Profesor Kraepelin, quien en 1910 incluyó, por primera vez, el epónimo "Enfermedad de Alzheimer" en la 8ª Edición de su texto "Manual de Psiquiatría para médicos y estudiantes". Alois Alzheimer describió, posteriormente, otro paciente (Johann F.) con la misma patología, pero en un estado de evolución diferente, pues en su cerebro sólo encontró placas seniles, no hallando ovillos neurofibrilares (Maurer y col., 1997; Graeber, 2003; Hippus y Neundörfer, 2003; Ezquerro, 2007); un siglo después de su muerte, se ha sabido que Johann F. es un típico caso en cuya familia, datada desde 1670, se presenta una predisposición a demencia presenil (Klünemann y col., 2002). La contribución de Alois Alzheimer,

pese a las reticencias iniciales en la comunidad científica, fue, no obstante, pronto aceptada por sus discípulos, los cuales le fueron remitiendo pacientes, tal y como hiciera en 1911 el histopatólogo español Gonzalo Rodríguez Lafora. Tras varias décadas en las que distintos neuropatólogos fueron confirmando, caso a caso, el hallazgo de Alois Alzheimer, no fue hasta los años 60 cuando se popularizó la terminología y se estableció la EA como causante del 60 % de casos de demencia (Ezquerro, 2007).

A lo largo de la historia, se ha dudado acerca de si los dos únicos pacientes descritos por Alois Alzheimer cumplían los requisitos necesarios como para ser considerados enfermos de Alzheimer. La recuperación de la documentación clínica original correspondiente a Auguste Detter, con referencias manuscritas propias y varias

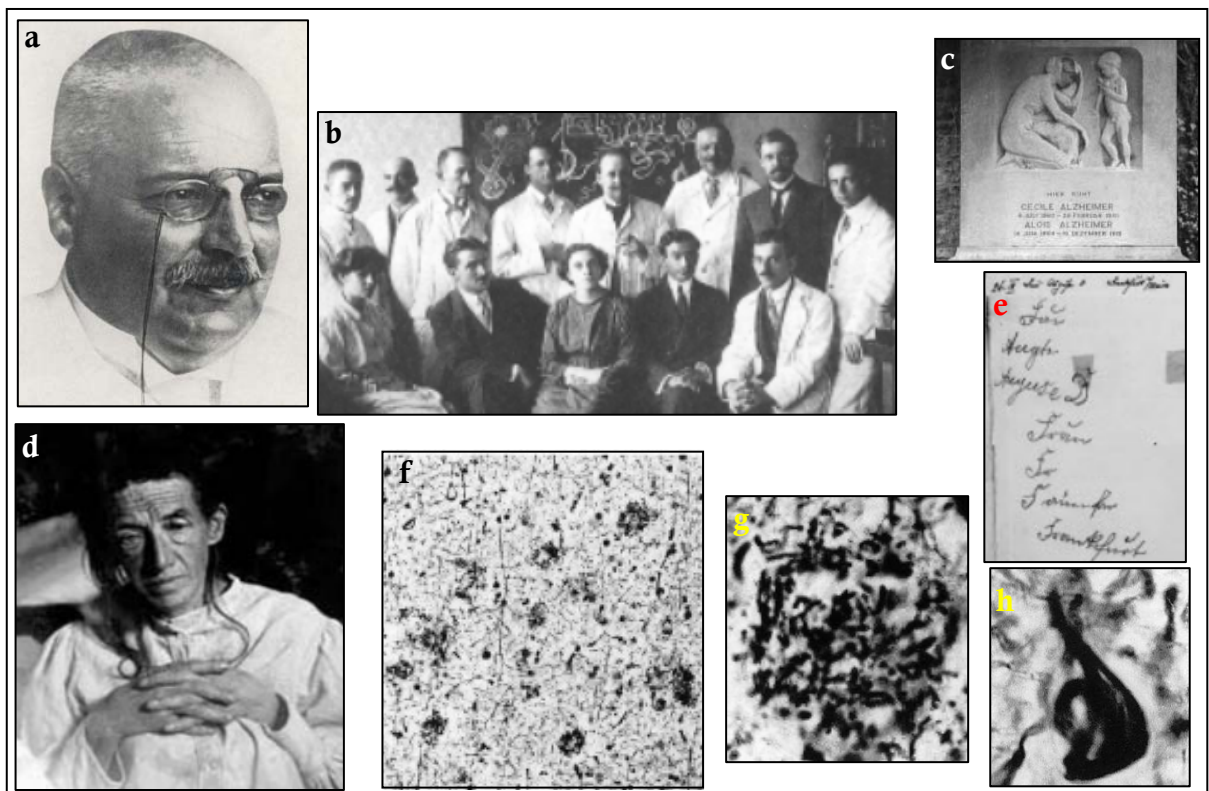


Fig. 1.- Historia del descubrimiento de la enfermedad de Alzheimer.

- a) Retrato del psiquiatra clínico y forense y neuroanatomista Alois Alzheimer. El original se encuentra en la biblioteca histórica del Instituto Max-Planck de Neurobiología, Martinsried, Alemania; b) Fotografía de Alois Alzheimer con sus colaboradores en Munich, tomada en 1909 aproximadamente (detrás, de izquierda a derecha: F. Lotmar, desconocido, S. Rosental., ¿Allers?, desconocido, A. Alzheimer, M. Achúcarro, F. H. Levy; delante, de izquierda a derecha: Sra. Grombach, U. Cerletti, desconocido, F. Bonfiglio y G. Perusini.); c) Foto de la tumba del matrimonio Alzheimer, sita en el cementerio de Frankfurt; d) Imagen de la paciente Auguste Detter; e) Escritura de la misma paciente; f), g) y h) Sección histológica, placa senil y ovillo neurofibrilar del cerebro de la paciente Auguste Detter, respectivamente.

Fuentes: Graeber, 2003; Hippus y Neundörfer, 2003; Ezquerro, 2007

fotografías de la enferma (Fig. 1 d y e) en los archivos del Hospital Clínico de Frankfurt realizada por Maurer y colaboradores, en 1995 (Maurer y col., 1997), así como el reanálisis de las preparaciones histológicas del cerebro de la paciente (Fig. 1 f, g y h) por el profesor Manuel Graeber en 1998 (Graeber, 1999) han resuelto cualquier atisbo de duda. De hecho, Auguste y Johann fueron genotipados y resultaron ser homocigotos para la APOE $\epsilon 3^4$ (Ezquerro, 2007); además, Auguste portaba la mutación T526C en la presenilina 1 (Müller y col., 2013).

Desgraciadamente, Alois Alzheimer murió joven, a los 51 años, en 1915, mucho antes de que su apellido llegara a ser una palabra casi coloquial.

Como se ha comentado anteriormente, la EA es la causa más frecuente de demencia. Se caracteriza por un declive progresivo de la cognición que suele comenzar con una alteración en la capacidad de crear memoria a corto plazo y que se suele continuar con alteraciones del comportamiento, dificultad en el lenguaje y en la capacidad de comunicarse y problemas visuales. Todo ello, inevitablemente, acaba afectando funciones tanto intelectivas, como físicas del paciente, conllevando a una total dependencia del mismo en las actividades básicas de la vida y, finalmente, a una muerte prematura (Dubois y col., 2010; Querfurth y La Ferla, 2010; Mayeux y Stern, 2012). La causa de toda esta sintomatología es la neurodegeneración de ciertas áreas cerebrales, lo cual es quizás el desenlace de la patología.

4.2 MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La población neuronal más vulnerable en la EA son las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. Sin embargo, aún desconocemos el proceso exacto a través del cual se produce la neurodegeneración, así como porqué este tipo neuronal presenta una mayor vulnerabilidad.

A lo largo de la patología se advierten muy diversos cambios neuropatológicos:

⁴ APOE $\epsilon 3$: Isoforma $\epsilon 3$ de la apolipoproteína E

4.2.1 AGREGACIÓN PROTEICA: en todas las enfermedades neurodegenerativas, se advierten agregados proteicos; los más característicos de la EA¹ son:

4.2.1.a Placas seniles (Figs. 1f y g y 7c y d): Son agregados extracelulares compuestos fundamentalmente por el péptido β -amiloide (βA^5), en especial las conformaciones con más capacidad de agregación, como el βA_{1-40}^6 y el βA_{1-42}^7 (Serrano-Pozo y col., 2011a), aunque también pueden aparecer diversas proteínas, como tau, proteínas de neurofilamentos y APOs⁸ E y J (Castellani y col., 2010). Se distinguen las placas seniles difusas (que se encuentran comúnmente en cerebros sanos de personas longevas (Serrano-Pozo y col., 2011a) de las de núcleo denso, que se relacionan con la demencia y están asociadas con la aparición de neuritas distróficas, pérdida sináptica, muerte neuronal y activación de células gliales (Itagaki y col., 1989; Masliah y col., 1990; 1994; Knowles y col. 1999).

Las placas seniles se acumulan de manera generalizada en el isocórtex, después, en distintas cortezas de asociación y, finalmente, en el cerebelo, en núcleos subcorticales y estriado, afectando a circuitos neurales implicados en la regulación de la cognición (Ishibashi y col., 2014). Los cúmulos amiloideos se encuentran en las 6 capas del isocórtex e, incluso, en avanzados casos de la patología, se extienden a la materia blanca (Braak y Braak, 1991). La distribución topográfica de las placas seniles se considera como un criterio diagnóstico, puesto que la carga amiloidea en el isocórtex asociativo temporal aparece antes de la aparición de la sintomatología (Ingelsson y col., 2004; Jack y col., 2009).

El βA es un péptido secretado, procedente del procesamiento catalítico de la APP⁹ (esquematisado en la Fig. 2). Los catabolitos de la APP desempeñan distintos papeles fisiológicos, tales como la regulación de canales iónicos, el control de la homeostasia celular o la activación de la transcripción (Octave y col., 2013). En condiciones normales, los mecanismos de degradación y aclaramiento del βA se encuentran en

⁵ βA : Péptido β -amiloide

⁶ βA_{1-40} : Péptido β -amiloide formado por 40 aminoácidos

⁷ βA_{1-42} : Péptido β -amiloide formado por 42 aminoácidos

⁸ APOs: Apolipoproteínas

⁹ APP: Proteína precursora del péptido β -amiloide

equilibrio; sin embargo, si se altera dicho equilibrio, sus niveles se elevarán, favoreciendo su acumulación en forma de oligómeros tóxicos, especialmente de las formas más agregantes, βA_{1-40} y βA_{1-42} (Saïdo, 2013). La APP es procesada mediante dos vías catalíticas distintas (Fig. 2); en la minoritaria, por acción de la β -secretasa (también llamada BACE1¹⁰) y de la γ -secretasa, se libera el βA , el cual puede contener distinto número de aminoácidos (de 39 a 43). Se ha postulado un papel fisiológico del βA como modulador positivo de la neurotransmisión, pues niveles en el rango picomolar del βA_{1-42} facilitan la potenciación perdurable (mecanismo de señalización que media la formación de memoria) (Pearson y Peers, 2006; Puzzo y col., 2008).

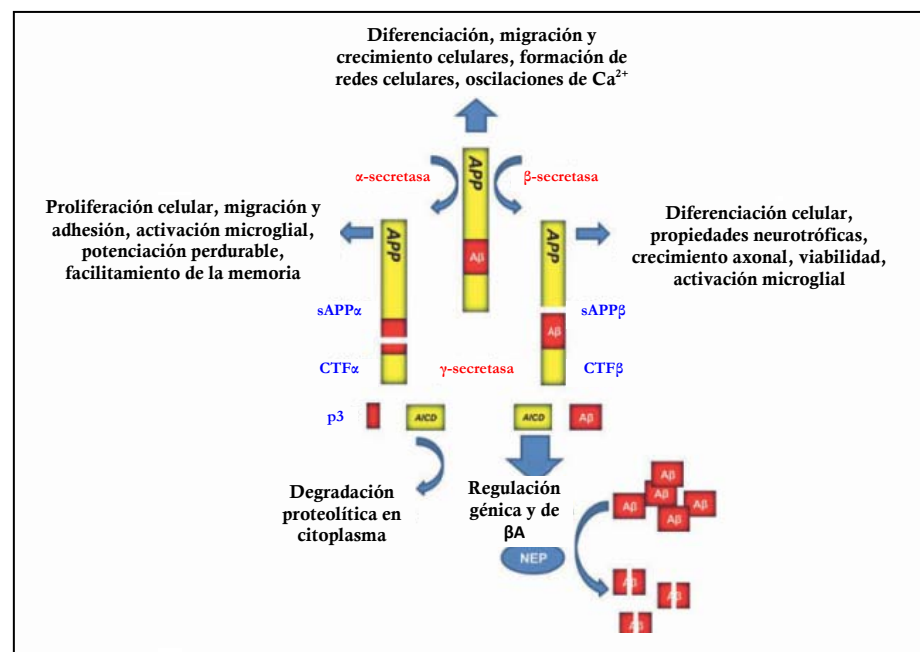


Fig. 2.- **Procesamiento catalítico de la proteína precursora de amiloide (APP) y papel de los distintos péptidos secretados.**

El procesamiento de APP mediado por la α -secretasa genera como productos la forma soluble α (sAPP α) y el grupo carboxi-terminal correspondiente (CTF α), el cual será procesado por la γ -secretasa originando al dominio intracelular de APP (AICD) y al fragmento p3. El procesamiento de APP mediado por la β -secretasa genera la forma soluble β (sAPP β) y el grupo carboxi-terminal correspondiente (CTF β), el cual será procesado por la γ -secretasa originando al dominio intracelular de APP (AICD) y al péptido β -amiloide; este último es degradado por la neprilisina (NEP).

Fuente: Modificado de Octave y col., 2003

¹⁰ BACE1: Acrónimo inglés "β-site APP cleaving enzyme 1" que alude a la β-secretasa

Las enzimas fundamentalmente implicadas en los mecanismos de degradación del β A son las endopeptidasas de membrana neprilisina y la enzima degradadora de la insulina (IDE¹¹), las enzimas convertidoras de endotelina (ECEs¹²) y las metaloproteasas de matriz (MMPs¹³); todas ellas son dependientes de Zn^{2+} (Saido, 2013); éste se disregula en la EA y tiende a acumularse en las placas seniles (Lovell y col., 1998), lo que, a su vez, favorece la acumulación del β A (Bush y col., 1994). Sin embargo, en el córtex entorrinal y el hipocampo de los cerebros de pacientes de Alzheimer, y en concordancia con el incremento de los niveles de βA_{1-42} , se aprecia una reducción tanto de la expresión, como de la actividad de neprilisina y de IDE (Zhao y col., 2007; Hellström-Lindahl y col., 2008). Por su parte, la extravasación del β A desde el parénquima cerebral está mediado por elementos de la barrera hematoencefálica (BHE¹⁴), a través del receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE¹⁵), del receptor de LDL¹⁶ y de la proteína relacionada con el receptor de LDL, LRP¹⁷ (Shibata y col., 2000; Lee, 2001; Sagare y col., 2012).

A pesar de que la producción y acumulación de β A ocurre en distintos tejidos, como el hígado, el músculo o las plaquetas (Roher y col., 2009), se desconoce porqué las neuronas son más vulnerables. Además, pese a que se desconocen los mecanismos exactos, en los cerebros de pacientes de Alzheimer (tanto en la materia gris como la blanca) presentan más cantidad de β A que los de cerebros sanos, en especial βA_{1-40} y βA_{1-42} (Selkoe y col., 1988; Wang y col., 1999; Roher y col., 2002; 2010; Van Helmond y col., 2010).

Con respecto al efecto del β A sobre las células, éste puede ser desde el exterior celular, si procede de la APP de membrana plasmática, o desde el interior, si es endocitado, o bien procede de la APP de las membranas del

¹¹ IDE: Acrónimo inglés "insuline-degrading enzyme" que designa a la enzima degradadora de insulina

¹² ECEs: Enzimas convertidoras de endotelina

¹³ MMPs: Acrónimo inglés "matrix metalloproteinases" que alude a las metaloproteasas de matriz

¹⁴ BHE: Barrera hematoencefálica

¹⁵ RAGE: Acrónimo inglés del receptor para productos finales de glicación avanzada "Receptor for Advanced Glycation End-products"

¹⁶ LDL: Del inglés, "Low-Density Lipoproteins", lipoproteínas de baja densidad

¹⁷ LRP: Del inglés "LDL receptor Related Protein", designa a la proteína relacionada con el receptor de LDL

retículo endoplásmico (RE¹⁸), mitocondria o aparato de Golgi (LaFerla y col., 2007; Sakono y Zako, 2010; Luan y col., 2013). En cualquier caso, se han descrito muy diversos mecanismos de neurotoxicidad para el β A, que han sido resumidos en la Tabla 1.

MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE		
EFEECTO	MECANISMO	REFERENCIAS
Alteración en la homeostasia del Ca^{2+}	Formación de poros que permean Ca^{2+} \Rightarrow sobrecarga de Ca^{2+}	Arispe y col., 2007; Sanz-Blasco y col., 2008; Sepúlveda y col., 2010; Demuro y col., 2011; Kawahara y col., 2011
	\downarrow subunidad R2Glu de los RGlu tipo AMPA $\Rightarrow \uparrow$ su permeabilidad	Resende y col., 2007
	Activación directa de los GluR tipo AMPA y NMDA	Alberdi y col., 2010
	Sobre-expresión del mGluR5	Grolla y col., 2013
	Sobre-expresión del RIP_3 1	
	Agonismo de nAChRs $\alpha 7$ (pM) y $\alpha 4\beta 2$ (nM)	Chin y col., 2007
	Potenciación de activación de CCDV	Price y col., 1998
	Bloqueo de los canales de K^+ dependientes de voltaje	Good y col., 1996
	Depleción del Ca^{2+} del RE a través de Bax	Ferreiro y col., 2008

Tabla 1 (cont.).- **Mecanismos de toxicidad del péptido β -amiloide (β A).**

El β A altera numerosos elementos subcelulares que confluyen en la dishomeostasia del Ca^{2+} , disfunciones mitocondriales y generación de estrés oxidativo, agregación de tau y, finalmente, alteraciones sinápticas.

RGlu: Receptor de glutamato; AMPA: Acrónimo inglés " α -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid", siendo el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4isoxazolpropiónico;

NMDA: N-metil-D-aspartato; RIP_3 : Receptor de Inositol 1,4,5-trisfosfato; nAChRs: Receptores nicotínicos de acetilcolina; CCDV: Canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje; RE: Retículo endoplásmico

¹⁸ RE: Retículo endoplásmico

MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE (2)		
EFEECTO	MECANISMO	REFERENCIAS
Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo	Formación de poros que permean Ca^{2+} + translocación a través de TOM \Rightarrow sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial	Arispe y col., 2007; Sanz-Blasco y col., 2008; Hansson Petersen y col., 2008; Sepúlveda y col., 2010; datos de nuestro laboratorio
	\uparrow pH mitocondrial	datos de nuestro laboratorio
	\downarrow enzimas de la cadena de transporte de electrones \Rightarrow \downarrow síntesis de ATP	Manczak y col., 2006; Reddy y Beal, 2008
	\downarrow enzimas de la cadena de transporte de electrones \Rightarrow formación RL	Manczak y col., 2006; Reddy y Beal, 2008
	Interacción con la ciclofilina D \Rightarrow apertura del mPTP \Rightarrow apoptosis	Sanz-Blasco y col., 2008; Alberdi y col., 2010; Du y Yan, 2010
	Alteración de proteínas de tráfico mitocondrial \Rightarrow \downarrow transporte axonal anterógrado de las mitocondrias	Wang y col., 2008; Reddy y Beal, 2008; Reddy y col., 2010; Manczak y col., 2010; Calkins y Reddy, 2011
	Alteraciones en el ADN mitocondrial de los elementos de la cadena de transporte de electrones	Lin y col., 2002; Manczak y col., 2004
	\downarrow GSH + \uparrow NADPH = \uparrow RL	Shimohama y col., 2000; Abramov y Duchon, 2005; De La Monte y Wands, 2006
	Peroxidación lipídica, proteínas carboniladas y oxidadas y daño oxidativo en el ADN	Smith y col., 1991; Gabitta y col., 1998; Butterfield y col., 2002
	\uparrow RL \Rightarrow \uparrow señalización a través de RIP_3 s, RRi y $\text{PMCA} \Rightarrow \uparrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}} \Rightarrow \uparrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}} \Rightarrow \uparrow$ RL	Lock y col., 2011; Müller y col., 2011

Tabla 1 (cont.).- **Mecanismos de toxicidad del péptido β -amiloide (β A).**

El β A altera numerosos elementos subcelulares que confluyen en la dishomeostasia del Ca^{2+} , disfunciones mitocondriales y generación de estrés oxidativo, agregación de tau y, finalmente, alteraciones sinápticas.

TOM: Translocasa de la membrana mitocondrial interna; RL: Radicales libres; mPTP: poro mitocondrial de permeabilidad transitoria; GSH: Glutacion reducido; NADPH: Dinucleótido de Nicotinamida adenina fosfato reducido; RIP_3 : Receptor de Inositol 1,4,5-trisfosfato; RRi : Receptores de Rianodina; PMCA : Ca^{2+} ATP-asa de la membrana plasmática; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$: Concentración de Ca^{2+} citosólica; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$: Concentración de Ca^{2+} mitocondrial

MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE (3)		
EFEECTO	MECANISMO	REFERENCIAS
Agregación de tau	$\uparrow [Ca^{2+}]_{cit} \Rightarrow \uparrow GSK3\beta \Rightarrow$ hiperfosforilación de tau	Takashima y col., 1995; Koh y col., 2008; Luan y col., 2013
	Alteración de la función del proteasoma	Tseng y col., 2008
	\uparrow caspasa 3 \Rightarrow truncamiento de tau	Garwood y col., 2011; Gamblin y col., 2003
	\uparrow cinasas de tau (PDPK, PKA \Rightarrow Hiperfosforilación de tau	Luan y col., 2013
Alteraciones sinápticas	Alteración de proteínas de tráfico mitocondrial $\Rightarrow \downarrow$ del transporte axonal anterógrado de las mitocondrias	Wang y col., 2008; Reddy y Beal, 2008; Reddy y col., 2010; Manczak y col., 2010; Calkins y Reddy, 2011
	\downarrow proteínas presinápticas (MAP2, sinaptofisina, sinatobrevina2) y postsinápticas (sinaptopodina, PSD95)	Reddy y col., 2005; Sepúlveda y col., 2010; Calkins y Reddy, 2011
	\downarrow AMPc $\Rightarrow \downarrow$ PKA $\Rightarrow \downarrow$ CREB $\Rightarrow \downarrow$ potenciación perdurable	Chen y col., 2000; Selkoe, 2002; Vitolo y col., 2002
	Secuestro de Zn^{2+}	Bush, 2003

Tabla 1 (cont.).- **Mecanismos de toxicidad del péptido β -amiloide (β A).**

El β A altera numerosos elementos subcelulares que confluyen en la dishomeostasia del Ca^{2+} , disfunciones mitocondriales y generación de estrés oxidativo, agregación de tau y, finalmente, alteraciones sinápticas.

$[Ca^{2+}]_{cit}$: Concentración de Ca^{2+} citosólica; GSK3 β : Cinasa 3 β de la glucógeno sintasa; caspasa: cisteinil aspartato proteasa; PDPK: Proteína cinasa dirigida por prolina; PKA: Cinasa dependiente de AMP cíclico; MAP: Proteína asociada a microtúbulos; PSD95: Acrónimo inglés de "postsynaptic density protein 95"; AMPc: AMP cíclico; CREB: En inglés, "cAMP response element-binding", es decir, elemento de unión de respuesta al AMPc

Para finalizar, se ha descrito que el β A, se transfiere entre las neuronas a través de las sinapsis; esta transferencia trans-sináptica podría explicar la dispersión de la patología a lo largo del cerebro (Nath y col., 2012).

En la neurotoxicidad del β A se basa la **hipótesis amiloidea** de la EA (Hardy y Selkoe, 2002; Irvine y col., 2008; Fig. 3). Sin embargo esta teoría no se valida en la clínica, pues por ejemplo numerosos estudios basados, en inmunoterapia anti- β A han fracasado, debido a que aunque las placas seniles desaparecen, no se aprecian diferencias en la aparición de los ovillos neurofibrilares ni se detiene el inexorable curso de la enfermedad (sea Holmes y col., 2008 un ejemplo de estos estudios). Quizás la cuestión es si cuando se aplica el fármaco, se está

interviniendo en una etapa de la patología demasiado tardía (Dubois, 2010); o quizás el péptido βA no sea la diana terapéutica adecuada.

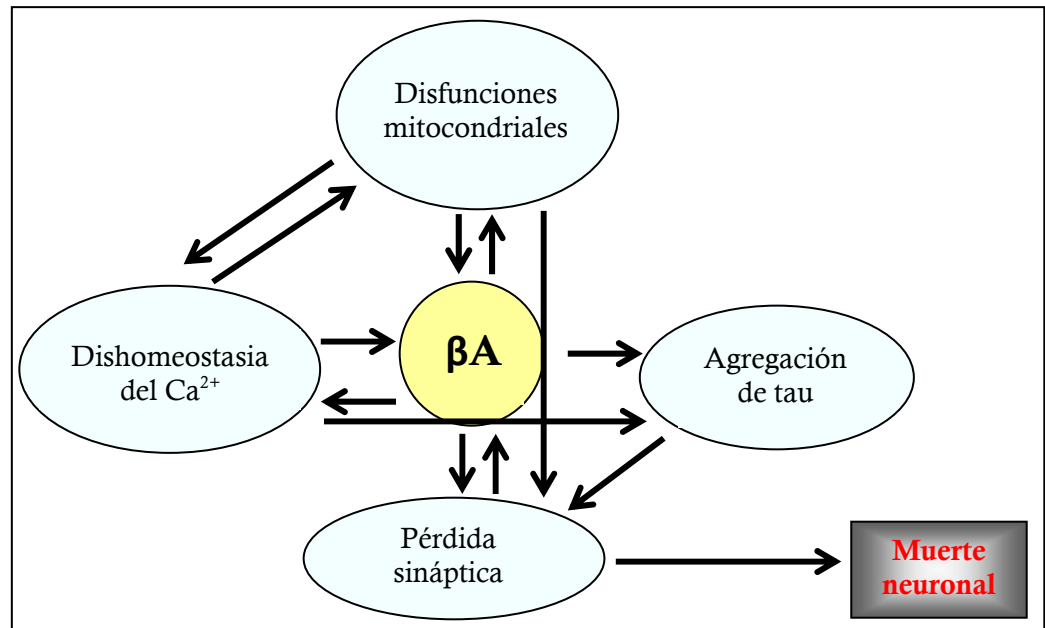


Fig. 3.- Papel central del péptido β -amiloide (βA) en la neurodegeneración. Distintas alteraciones en la homeostasia del Ca^{2+} , así como disfunciones mitocondriales promueven una producción exacerbada del péptido, el cual, a su vez conlleva perturbaciones en la homeostasia del Ca^{2+} y alteraciones mitocondriales. El βA induce la agregación de tau por mecanismos tanto dependientes como independientes del Ca^{2+} . Finalmente, se ocasiona una pérdida sináptica que acaba desembocando en la muerte de las neuronas.

4.2.1.b Angiopatía amiloidea: Se trata de depósitos de βA , especialmente βA_{1-40} en la túnica media y cortical de los capilares, arteriolas y arterias pequeñas medianas y leptomeníngicas (Fig. 7e). Probablemente, durante la EA, los niveles elevados de βA saturan sus mecanismos de extravasación, alterando la función celular de los vasos y conllevando a la acumulación del péptido, el cual debilita su pared (Tian y col., 2006; Armstrong, 2013) y desorganiza la unidad vascular, ya que el βA provoca una retracción de los pies astrocitarios (Merlini y col., 2011) y una degeneración de los pericitos (Verbeek y col., 1997). Como consecuencia, se establece una patología vascular, que favorece el deterioro cognitivo, así como la aparición de complicaciones hemorrágicas de la patología (Pfeifer y col., 2002; Greenberg y col., 2004; Serrano-Pozo y col., 2011a; Alexander y col., 2013)

4.2.1.c Ovillos neurofibrilares: (Figs. 1h, 7a y b): Son agregados intracelulares formados principalmente por la MAP¹⁹ tau la cual se halla hiperfosforilada y aberrantemente plegada, debido a un truncamiento en la región carboxi-terminal, que favorece su agregación (Gamblin y col., 2003). También aparecen agregados otros elementos, como vimentina, tropomiosina, α 1-quimiotripsina, proteoglicanos, APOE²⁰ o productos de glicosilación avanzada (Smith, 1998). En condiciones normales, la fosforilación de tau disminuye su afinidad por los microtúbulos y éstos, así, pueden reorganizarse y permitir el tráfico intracelular. Hay multitud de cinasas que fosforilan tau, como la PDPK²¹, las MAPKs²², la GSK3 β ²³, la PKA²⁴ o la CaMKII²⁵, entre otras (Sergeant y col., 2008). Por su parte, el equilibrio de fosforilación de tau se mantiene gracias a la actividad de fosfoproteínas fosfatasas (PP²⁶), como la PP2A, PP1, PP5 y PP2B (Liu y col., 2005). Durante la EA¹, se sobre-activan los mecanismos de fosforilación (como la GSK3 β ²³, mediado por el β A₁₋₄₂) (Takashima y col., 1995; Koh y col., 2008), mientras que se reducen los de desfosforilación (PP2A) (Sontang y col., 2004), lo que conlleva a una hiperfosforilación de tau, y ésta adquiere una ganancia de función, tendiendo a la agregación (Grendron y Petrucelli, 2009). En estas condiciones patológicas, se ve alterado el transporte axonal rápido anterógrado, lo que conlleva a una pérdida de eficacia sináptica, al carecerse de elementos fundamentales (como las mitocondrias o las vesículas sinápticas) y, finalmente, pérdida de sinapsis y neurodegeneración (Alonso y col., 1996; Stamer y col., 2002; Stokin y col., 2005; Grendron y Petrucelli, 2009; Ward y col., 2012). De hecho, niveles elevados de tau hiperfosforilada en el líquido cefalorraquídeo

¹⁹ MAP: Proteína asociada a microtúbulos

²⁰ APOE: Apolipoproteína E

²¹ PDPK: Proteína cinasa de serina y treonina dirigida por prolina, del inglés "proline directed serin/threonin protein-kinase"

²² MAPKs: Proteínas cinasas activadas por mitógenos, del inglés "mitogen-activated protein-kinase"

²³ GSK3 β : Proteína cinasa de la sintasa de glucógeno 3 β , del inglés "glucogene synthase kinase 3 β "

²⁴ PKA: Proteína cinasa dependiente de AMP cíclico

²⁵ CAMKII: Proteína cinasa II dependiente de Ca²⁺-calmodulina, del inglés "Ca²⁺-calmoduline kinase II"

²⁶ PP: Fosfoproteínas fosfatasas

(LCR²⁷) se consideran biomarcadores predictivos de la neurodegeneración (Buerger y col., 2006). La degeneración neurofibrilar se restringe de manera espaciotemporal, de manera que se pueden distinguir tres etapas consecutivas: la entorrinal (apareciendo los ovillos en las cortezas transentorrinal, entorrinal y formación hipocampal), la límbica (expandiéndose los ovillos a la amígdala, tálamo y claustró) y la isocortical (afectándose las cortezas asociativas y, posteriormente, cortezas sensoriales y motoras primarias) (Braak y Braak, 1991). Las células fundamentalmente afectadas incluyen neuronas estrelladas de la capa II, neuronas grandes multipolares de la capa IV y neuronas piramidales de las capas III y V (Hyman y col., 1984). La cantidad y distribución de los ovillos neurofibrilares se correlacionan con la severidad y la duración de la demencia (Arriagada y col., 1992; Bierer y col., 1995).

Al igual que ocurre con el β A, existen transferencias trans-sinápticas de tau, lo que favorece la expansión de la taupatía (Gerson y Kayed, 2013; Dujardin y col., 2014).

4.2.1.d Cuerpos de Hirano: Son inclusiones eosinófilas en el citoplasma de las neuronas (Fig. 7g), formadas por distintas proteínas del citoesqueleto, tales como proteínas de neurofilamentos (Schmidt y col., 1989), actina (Goldman y col., 1983, Galloway y col., 1987a), la cual puede hallarse truncada por acción de las caspasas²⁸ (Rossiter y col., 2000), tropomiosina (Galloway y col., 1987b), tau (Galloway y col., 1987a); iNOS²⁹; productos terminales de glicación avanzada (Münch y col., 1998) y fragmentos carboxi-terminales de APP (Muñoz y col. 1993; Hirano, 1994).

4.2.2 DISFUNCIONES MITOCONDRIALES: Los pacientes de EA presentan alteraciones mitocondriales, como una reducción en la actividad de los complejos I, III, IV y V de la cadena de transporte de electrones, una elevación

²⁷ LCR: Líquido cefalorraquídeo

²⁸ Caspasas: Original acrónimo de cisteinil-aspartato proteasas

²⁹ iNOS: Sintasa inducible de óxido nítrico, proveniente del inglés "inducible nitric oxide synthase"

del RNAm de la SOD³⁰ o una relación de las proteínas mitocondriales Bax/Bcl2 tendente a la apoptosis. Ello acontece no solo en sus cerebros, sino también en sus células periféricas, como linfocitos o plaquetas; incluso, éstos aparecen antes de la amiloidopatía y la taupatía, lo que podría configurarse como un biomarcador (Gibson, 2002; de la Monte y Wands, 2006; Leuner y col., 2007; Moreira y col., 2010; Jaworska y col., 2013; Hrouduvá y col., 2014). Por otra parte, también se ha descrito una disminución de las proteínas implicadas en la biogénesis mitocondrial de las neuronas del hipocampo, como los factores nucleares respiratorios (NRF³¹) 1 y 2, el coactivador 1 α del PPAR γ (PGC-1 α ³²) (Sheng y col., 2012) o Drp1. Las alteraciones en la biogénesis mitocondrial, así como los déficits en los mecanismos de fisión/fusión mitocondrial comprometen energéticamente a la célula (Hrouduvá y col., 2014). La mitofagia es un mecanismo de control de calidad de las mitocondrias, de manera que las mitocondrias dañadas son recicladas por este mecanismo; es frecuente en los cerebros de pacientes de Alzheimer la aparición de vesículas autofágicas incompletas (Correia y col., 2012).

Finalmente, se ha observado que la hipoxia ocuriente durante la patología vascular asociada a la EA genera una respuesta al estrés oxidativo a nivel mitocondrial. Así, el principal regulador de las respuestas a hipoxia, el factor 1 α inducible por hipoxia (HIF1 α ³³), aparece sobre-expresado en las microvesículas vasculares de los cerebros de pacientes de Alzheimer (Grammas y col., 2006); HIF1 α ³³, a su vez, se une al promotor de BACE1, induciendo su expresión génica y exacerbando así la síntesis del β A (Sun y col., 2006). La hipoxia, además, aumenta los niveles funcionales de un componente de la γ -secretasa, la APH-1 α , (Li y col., 2009) y disminuye los niveles de neprilisina (Wang y col., 2011) y de ECE (Fisk y col., 2006).

Todas estas alteraciones mitocondriales, que en ocasiones son advertidas con anterioridad a la amiloidopatía o a la taupatía han hecho pensar a numerosos autores en la **hipótesis de la cascada mitocondrial** como causante de la patología (Swerdlow, 2012). Curiosamente, un dato a favor de esta teoría es el

³⁰ SOD: Superóxido dismutasa

³¹ NRF: Acrónimo inglés de "nuclear respiratory factor" que alude al factor nuclear respiratorio

³² PGC-1 α : Coactivador 1 α del PPAR γ

³³ HIF1 α : Del inglés ("hypoxia inducible factor 1 α "), factor 1 α inducible por hipoxia

hecho de que la herencia de la EA parece ser predominantemente materna y que las personas cuyas madres sufren de Alzheimer presentan, antes de cualquier sintomatología, hipometabolismo cerebral (Mosconi y col., 2010; Armstron y col., 2013)

4.2.3 DISHOMEOSTASIA DEL Ca^{2+} : El Ca^{2+} es un mensajero intracelular que regula numerosas funciones celulares, desde la fertilización hasta la muerte celular, pasando por la contracción muscular, la transmisión sináptica o la regulación génica; por ello, es imprescindible regular finamente sus concentraciones de manera espacio-temporalmente (Berridge y col., 2013; 2014; Fig. 4). La señal de Ca^{2+} puede proceder del exterior o del interior celular. La entrada de Ca^{2+} desde el exterior puede ser por respuesta a estímulos, tales como la despolarización de la membrana, el estiramiento, estímulos nocivos, la unión de agonistas extracelulares a sus correspondientes receptores, la acción de mensajeros intracelulares o el vaciamiento de almacenes intracelulares de Ca^{2+} . La liberación de Ca^{2+} de estos almacenes intracelulares, como el RE, se regula por el mismo Ca^{2+} o por mensajeros intracelulares como el IP_3 ³⁴, la cADP³⁵, el NAADP³⁶ o la esfingosina-1-fosfato. Una vez en el interior celular, el Ca^{2+} ejerce sus funciones y es rápidamente eliminado para mantener un equilibrio constante; por una parte, es captado por bombas (como la SERCA³⁷ o la PMCA³⁸) y transportadores (como el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de membrana plasmática mpNCX³⁹ o el VDAC⁴⁰ de la membrana mitocondrial externa y el uniportador mitocondrial de Ca^{2+} , mUP⁴¹, expresado en la membrana mitocondrial interna), que retiran el Ca^{2+} del citosol hacia el exterior celular o hacia organelas; por otra parte, es captado por proteínas quelantes de Ca^{2+} como la calbindina, la parvalbúmina, la

³⁴ IP_3 : Inositol 1,4,5-trisfosfato

³⁵ cADP: Ribosa cíclica de adenosín difosfato, del inglés "cyclic adenosin diphosphate"

³⁶ NAADP: Ácido de dinucleótido de nicotina y adenina fosfato, procedente del inglés "nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate"

³⁷ SERCA: Acrónimo inglés "(sarco)-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase" que alude a la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico

³⁸ PMCA: Acrónimo inglés "plasma membrane Ca^{2+} ATPase" que alude a la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática

³⁹ mpNCX: Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática

⁴⁰ VDAC: Acrónimo inglés "voltage dependent anion channel" que define al canal aniónico dependiente de voltaje

⁴¹ mUP: Acrónimo inglés "mitochondrial uniporter" que alude al uniportador mitocondrial de Ca^{2+}

calsenilina, la calmirina, la calretinina o la calsecuestrina (estas dos últimas, residentes en el RE), que lo tamponan de manera rápida y eficaz (Berridge y col., 2013). La mitocondria juega un papel clave en la regulación de la homeostasia de Ca^{2+} , ya que es capaz de funcionar como un tamponador transitorio de Ca^{2+} , distribuyendo espacio-temporalmente dicha señal; la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria está mediada por el mUP, mientras que en la salida intervienen diversos elementos como el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX⁴²) y el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (en condiciones fisiológicas) o el mPTP⁴³ (en condiciones patológicas) (Graier y col., 2007). La mitocondria y el RE no ejercen su función moduladora de la homeostasia del Ca^{2+} independientemente, sino que se hallan físicamente relacionados, de manera que el Ca^{2+} que sale del RE es captado muy rápidamente por la mitocondria (Rizzuto y col., 1998); tal interacción entre las organelas está mediada por proteínas como Grp75, Opa1⁴⁴, Mfn⁴⁵ 1 y 2 o la presenilina 2, las cuales se encuentran enriquecidas en unas súper especializaciones de membrana llamadas membranas asociadas a mitocondrias (MAMs⁴⁶) (Zampese y col., 2011; Schon y Área-Gómez, 2013). El estrecho contacto existente entre la mitocondria y el RE es imprescindible para la correcta funcionalidad de la mitocondria, pues el flujo de Ca^{2+} , mediante la activación de distintas deshidrogenasas, mantiene un estado energético óptimo para la mitocondria; el alejamiento de estas organelas disminuye dicho flujo de Ca^{2+} , lo que genera un déficit energético, iniciándose así, el reciclaje de las mitocondrias mediante autofagia (Green y Wang, 2010). En la homeostasia del Ca^{2+} , brevemente descrita, intervienen multitud de elementos, interrelacionados entre sí y en numerosos casos recurrentes, con el fin mantener las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ ⁴⁷) basales en el rango de nanomolar (100-200 nM); ante un determinado estímulo la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ se incrementa transitoriamente para poder activar a los efectores. La

⁴² mNCX: Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial

⁴³ mPTP: Del inglés "mitochondrial permeability transition pore", alude al poro mitocondrial de permeabilidad transitoria

⁴⁴ Opa1: Acrónimo inglés de "optic atrophy 1", pues su delección conlleva una atrofia óptica severa

⁴⁵ Mfn: Mitofusina, del inglés "Mitofusin1"

⁴⁶ MAMs: Membranas asociadas a mitocondrias

⁴⁷ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$: Concentración intracelular de Ca^{2+}

desregulación a la larga de alguno de estos elementos conlleva a situaciones patológicas (Berridge, 2010; 2011; 2012; 2013; 2014).

De manera muy temprana en la patogenia de la EA, se han descrito alteraciones en la homeostasia del Ca^{2+} ; éstas no se restringen a las neuronas, sino que también se dan en células periféricas, lo que puede utilizarse como biomarcador. Así, mutaciones hereditarias en las presenilinas favorecen la salida de Ca^{2+} del RE, causando estrés reticular, incrementando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y, aumentando la producción del βA , el cual, a su vez, y como se ha visto anteriormente (Tabla 1), altera la homeostasia del Ca^{2+} (Green y La Ferla, 2008). También se ha descubierto que ciertas mutaciones de la presenilina 2 favorecen la aproximación entre la mitocondria y el RE, lo que causa estrés reticular y sobrecarga de Ca^{2+} a las mitocondrias (Zampese y col., 2011).

El análisis de esta señalización intracelular "in vivo" no es sencillo, pues las células suelen responder con mecanismos compensatorios (Jaworska y col., 2013) y el estudio de muestras post mórtem de pacientes de Alzheimer permite examinar solo las etapas finales de los procesos dependientes de Ca^{2+} , como la activación de proteasas, pero no la señalización del Ca^{2+} "in situ" (Green y col., 2007). Realizando estudios en ratones transgénicos que modelizan la patología hereditaria, se ha demostrado que la señalización de Ca^{2+} se encuentra exacerbada (como la entrada capacitativa de Ca^{2+} o los mecanismos de amplificación de Ca^{2+} mediados por los $\text{RIP}_3\text{s}^{48}$ y los RRI^{49}), especialmente en las regiones más próximas a las placas seniles (Oertner y Matus, 2005); además, las mutaciones en las presenilinas afectan a la homeostasia de Ca^{2+} reticular, tanto "per se", como a través de la interacción con los $\text{RIP}_3\text{s}^{48}$, los RRI^{49} o la SERCA (Green y LaFerla, 2008; Berridge, 2013).

Por otra parte, el glutamato es el principal neurotransmisor excitador de las neuronas corticales e hipocampales. En la EA se ha descrito que la enzima que interviene en la síntesis, la glutamina sintetasa, se encuentra oxidada, lo que

⁴⁸ RIP_3s : Receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato

⁴⁹ RRI : Receptores de rianodina

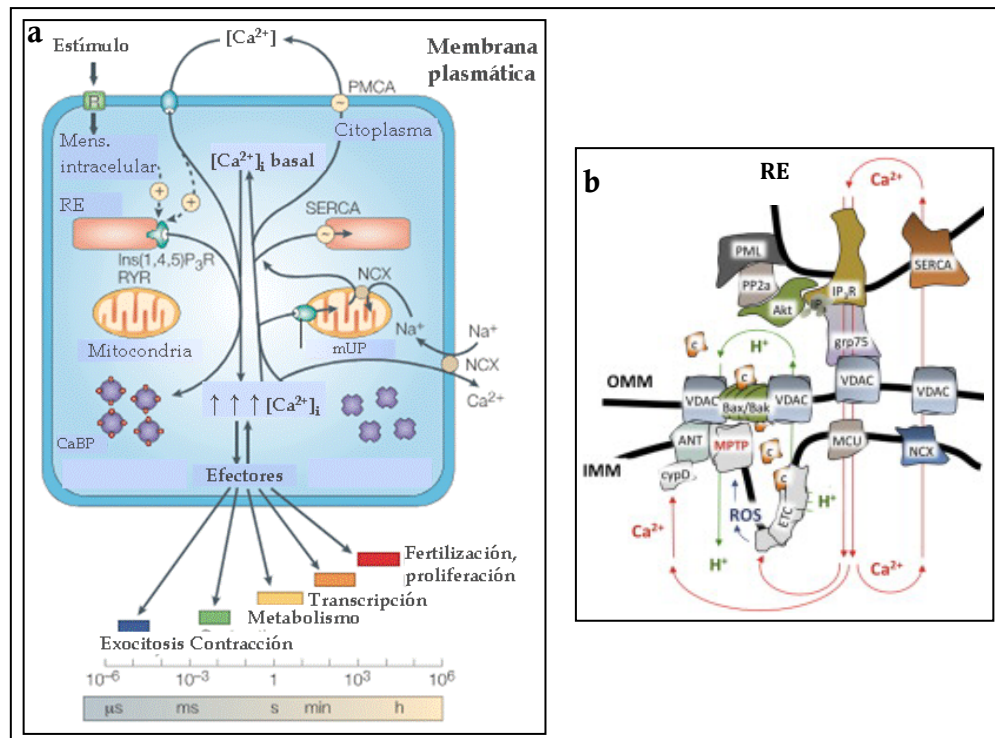


Fig.4.- Mecanismos que regulan la homeostasia del Ca^{2+} .

a) La unión de un estímulo su receptor (RM) incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelular al activar la salida de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico (RE) (a través de los receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{R}$) o de rianodina (RYR)); o la entrada a través de un canal de Ca^{2+} . El Ca^{2+} intracelular se eleva activando los efectores; o se aclara al ser recaptado por la mitocondria a través del uniportador mitocondrial (mUP, "Mitochondrial UniPorter"), por el RE a través de la SERCA ("Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase"), por las proteínas quelantes de Ca^{2+} (CaBP, " Ca^{2+} Binding Proteins") y por transportadores (como el intercambiador de Na^+ y Ca^{2+} , NCX) o la PMCA ("Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase"). (Fuente: Modificado de Berridge y col., 2013); b) Transferencia de Ca^{2+} entre el RE y la mitocondria a través de las membranas asociadas a mitocondrias. El Ca^{2+} que sale del RE a través del receptor de IP_3 (IP_3R) llega al canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) expresado en la membrana mitocondrial externa (OMM) y entra a la matriz a través del uniportador mitocondrial de Ca^{2+} (MCU), localizado en la membrana mitocondrial interna (IMM). El Ca^{2+} sale de la mitocondria fundamentalmente a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y del poro de permeabilidad transitoria (MPTP). A su vez, este Ca^{2+} puede ser recaptado por el RE a través de la Ca^{2+} -ATPasa reticular SERCA (Fuente: Jones y Szabadkai, 2010)

conlleva una excitotoxicidad mediada por una subsecuente sobrecarga celular y mitocondrial de Ca^{2+} , Na^{2+} y la formación excesiva de RL⁵⁰, que desencadena la muerte neuronal (Frandsen y col., 1989; Smith-Swintosky y Mattson, 1994; Luetjens y col., 2000).

Además, se ha descrito en cerebros de pacientes de Alzheimer una regulación a la baja de la expresión de proteínas quelantes de Ca^{2+} como la calbindina, en

⁵⁰ RL: Radicales libres

regiones especialmente relacionadas con los mecanismos de aprendizaje y memoria (giro dentado del hipocampo) (Palop, 2003; Berridge, 2013).

Finalmente, distintos estudios genéticos en pacientes de Alzheimer esporádico han apuntado hacia un nuevo mecanismo que altera tanto la homeostasia de Ca^{2+} como el metabolismo del βA , del cual hablaré más profusamente a lo largo de la presente memoria: el polimorfismo P86L del canal de Ca^{2+} CALHM1⁵¹, P86L-CALHM1 (Dreses-Werringloer y col., 2009).

Aunque aún desconocemos los mecanismos implicados, queda patente que en la EA se desarrolla una clara dishomeostasia del Ca^{2+} a distintos niveles subcelulares. Incluso, numerosos autores postulan con la **hipótesis del Ca^{2+}** sobre la etiología de la EA que es la dishomeostasia del Ca^{2+} la causante de la patología (LaFerla, 2002; Bezprozvanny y Mattson, 2008; Berridge 2010; 2011; 2013; 2014).

4.2.4 DEGENERACIÓN NEURONAL

4.2.4.a Degeneración gránulo-vacuolar: Consiste en la acumulación de grandes corpúsculos basófilos en vacuolas dentro del citoplasma de las neuronas piramidales hipocampales que confluyen en la muerte de la neurona (Fig. 7f)

4.2.4.b Pérdida sináptica: En la EA, se produce una pérdida notable de conexiones sinápticas y espinas dendríticas, no solo debido a la muerte neuronal, sino a una pérdida de la conectividad entre las neuronas que permanecen en los circuitos (Masliah y col., 1994; Ingelsson y col., 2004). Las sinapsis se materializan físicamente en las espinas dendríticas; recientemente, se ha comprobado que la reducción en el diámetro, número, longitud y volumen de las espinas dendríticas guarda una relación directa con la agregación de tau hiperfosforilada en los ovillos neurofibrilares (Fig. 7j; Merino-Serrais y col., 2013). La pérdida sináptica correlaciona perfectamente con el deterioro cognitivo ocuriente en la patología (Masliah y Terry, 1993)

4.2.4.c Vulnerabilidad colinérgica: Las neuronas que primero degeneran en la EA son neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, es decir el área

⁵¹ CALHM1: Acrónimo inglés de "CALcium Homeostasis Modulator 1" que designa al modulador 1 de la homeostasia del Ca^{2+}

que comprende el tálamo, el hipotálamo y el sistema límbico, el cual incluye, entre otras estructuras, la formación hipocampal. Estas áreas se conectan entre sí y junto al neocórtex en el circuito de Papez, el cual está implicado en la consolidación de la memoria. La neurodegeneración selectiva de esta población neuronal es responsable de la sintomatología de la EA (Davies y Maloney, 1976; Whitehouse y col., 1982). De hecho, en la clínica, sólo han demostrado eficacia inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE⁵²), que incrementan los niveles de acetilcolina (ACh⁵³) en la hendidura sináptica, como la tacrina, el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina (Giacobini, 1997). Esta vulnerabilidad neuronal selectiva ha dado lugar a la **hipótesis colinérgica** sobre la etiología de la EA (Davies y Maloney, 1976; Whitehouse y col., 1982). Sin embargo, aun se desconoce porqué las neuronas colinérgicas son más proclives a degenerar; probablemente, sea debido a que desarrollen una mayor sensibilidad a la dishomeostasia del Ca^{2+} ocurrente durante la EA, pues presentan una notable reducción en los niveles de calbindina (Riascos y col., 2011), una proteína quelante de Ca^{2+} , fundamental para tamponar Ca^{2+} y mediar la señalización de éste a través de su interacción con otras proteínas (Miller, 1991; Kojetin y col., 2006).

Por otra parte, el sitio periférico aniónico de la AChE⁵⁴ interacciona con el βA , facilitando su agregación (Inestrosa y col., 1996), por lo que las neuronas colinérgicas son más vulnerables no solo a la toxicidad mediada por Ca^{2+} , sino a la medida por los oligómeros del βA .

No obstante, es preciso hacer constar que, a lo largo de la patología, hay más tipos neuronales que degeneran, como las neuronas serotoninérgicas, lo cual se relaciona con otros síntomas como los delirios, las alucinaciones, la depresión y las alteraciones en el sueño (Fig 5; Meltzer y col., 1998)

⁵² AChE: Acetilcolinesterasa

⁵³ ACh: Acetilcolina

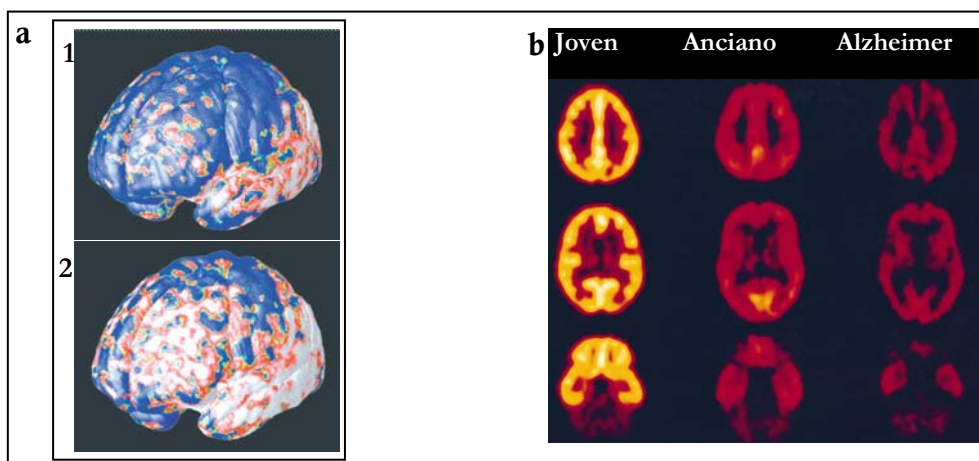


Fig. 5.- Neurodegeneración selectiva de neuronas observada con tomografía computerizada de emisión monofotónica (SPECT).

- a) Muerte de neuronas colinérgicas al inicio (1) y a los 18 meses (2) de la enfermedad. Imagen tomada con vesamicol-¹²⁵I como radio-trazador (Fuente: <http://users.loni.usc.edu/~thompson/MEDIA/USNEWS/brainscansLARGE.jpg>);
- b) Pérdida de neuronas serotoninérgicas en el envejecimiento y en el Alzheimer. Imagen tomada con tomografía de emisión de positrones y con [¹⁸F]altaserina como marcador fluorescente de células serotoninérgicas (Fuente: Meltzer y col., 1998)

4.2.4.d Atrofia cortical: Como consecuencia de la neurodegeneración, la corteza cerebral se ve reducida mientras que los ventrículos laterales se dilatan (Fig. 7h). Esta degeneración se acusa fundamentalmente en los lóbulos temporales mediales, aunque tiende a expandirse a las cortezas primarias motoras y sensoriales. Este patrón de degeneración aparece muy tempranamente en la patología y puede ser reconocido mediante técnicas de imagen con fines diagnósticos (Dickerson y col., 2009; 2011).

Como consecuencia de todos estos mecanismos, las neuronas acaban degenerando, de forma más patente según progresa la patología (Terry y col., 1981). El mecanismo de muerte neuronal es, fundamentalmente, mediante apoptosis (Ribe y col., 2008). Las neuronas piramidales afectadas muestran una elevación de distintas caspasas activas, como la 3 (Stadelmann y col., 1999) y la 6 (LeBlanc y col., 1999). Además, en los cerebros de pacientes, se encuentran numerosos productos derivados de la acción de las caspasas, como tau (Gamblin y col., 2003) o APP (Gervais y col., 1999) truncadas. Por otra parte, en distintas muestras cerebrales, aparece una clara descompensación de mecanismos reguladores de la apoptosis, como Bcl-2 (Lu y col., 2005) o Bim

(Biswas y col., 2007). En algunos casos, la apoptosis es subsecuente a fallos energéticos mitocondriales (Chen y Chan, 2009).

4.2.5 NEUROINFLAMACIÓN: En la EA, aparecen células gliales con un fenotipo inmunológicamente activo y citocinas pro-inflamatorias que, en último término, favorecen la progresión de la patología (Craft y col., 2006; Frank-Cannon y col., 2009). La microglía activada (Fig. 7h) y los astrocitos reactivos (Fig. 7i) tienden a asociarse con las placas seniles de núcleo denso, lo que señala al β A como principal inductor de la neuroinflamación (Itagaki y col., 1989; Vehmas y col., 2003). Sin embargo, aunque la carga amiloidea se estabilice a lo largo de la patología, la neuroinflamación continúa y comienza a guardar una mayor relación con degeneración neurofibrilar (Ingelsson y col. 2004, Serrano-Pozo y col., 2011b).

A la luz de todo lo expuesto, se puede resumir que la EA es debida a una muerte selectiva de neuronas. El mecanismo de neurodegeneración no está del todo esclarecido, aunque una posible teoría sería la expuesta en la Fig. 6.

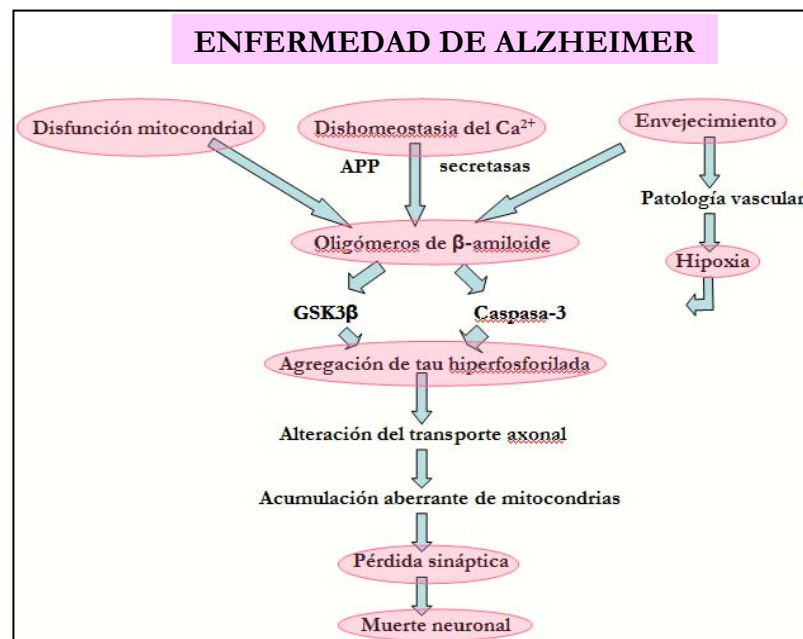


Fig. 6.- Secuencia de eventos patológicos ocurrente durante la enfermedad de Alzheimer. Las disfunciones mitocondriales, la disregulación de la homeostasia del Ca^{2+} , acompañada de distintos eventos ocurrentes durante el envejecimiento, como patologías vasculares, conllevan a la formación de los oligómeros del péptido β -amiloide, el cual favorece la hiperfosforilación y agregación de tau. Ello conlleva a una alteración en el transporte axonal, provocando que las sinapsis carezcan de elementos clave, como mitocondrias o vesículas sinápticas; la merma de eficacia sináptica conlleva a pérdida de sinapsis, la cual, junto a todos los elementos anteriormente expuestos, acaba desencadenado muerte neuronal.

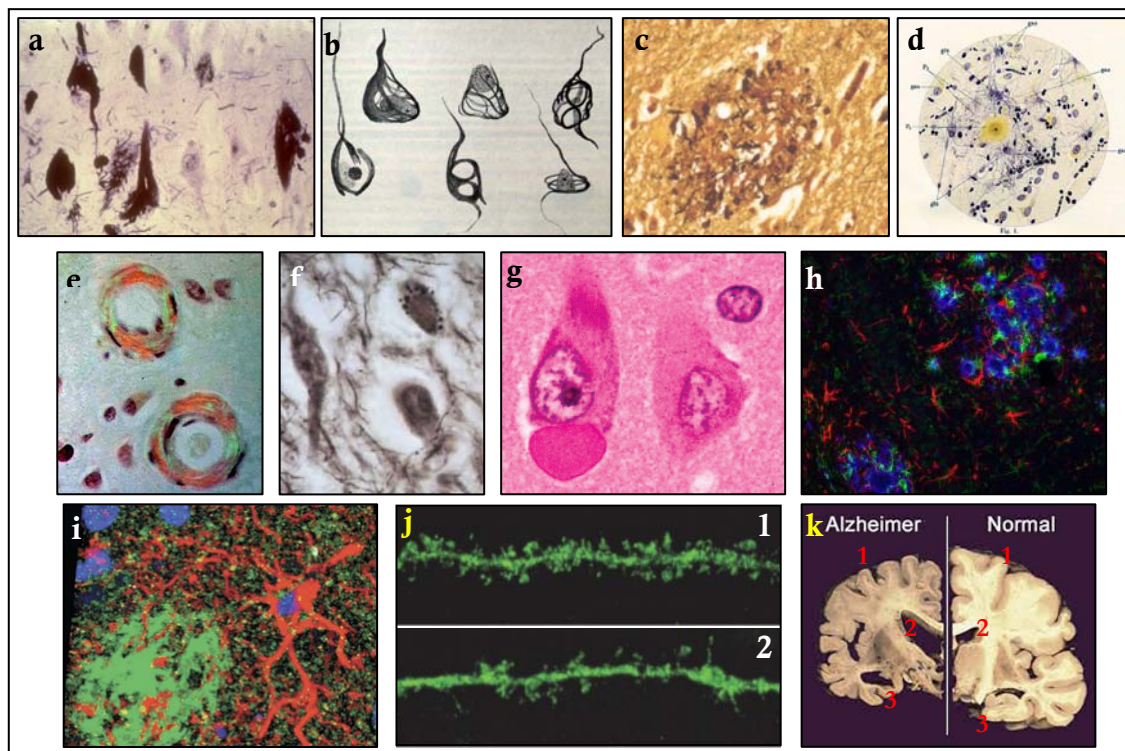


Fig. 7.- Características histopatológicas de los cerebros de los enfermos de Alzheimer.

a) Tinción de plata de ovillos neurofibrilares (Fuente:

<http://www.cuhk.edu.hk/med/paf/slides/neuropat/x-22.htm>); b y d) Respectivamente, dibujos de ovillos neurofibrilares y de distintas placas seniles (en amarillo), realizados por Alois Alzheimer (Fuente: Alzheimer, 1910). c) Tinción con tioflavina-S de una placa senil. Nótese las neuritas distróficas (filamentos más oscuros) (Fuente:

<https://wiki.brown.edu/confluence/display/BN0193S04/Schenk+et+al>); e) Tinción de arterias cerebrales recubiertas de depósito amiloideo (Fuente:

<http://www.iqb.es/neurologia/enfermedades/avc/angiopatiaamiloide05.jpg>); f) Impresión argéntica de degeneración gránulo-vacuolar (Fuente: Guimerà y col., 2002); g) A la izquierda, célula con cuerpo de Hirano en el polo basal teñido con eosina; nótese el núcleo, en localización marginal (Fuente: <http://www.studyblue.com/notes/note/n/pathology-/deck/114139>); h) Presencia de glía reactiva, marcada con Iba1 verde, alrededor de una placa senil (marcada en azul) (Fuente: <http://www.mayo.edu/research/labs/alzheimers-disease-inflammation/overview>); i) Astrocito reactivo (marcado con proteína fibrilar glial ácida GFAP roja) relacionado íntimamente con una placa senil (marcada en verde) (Fuente: Kay y col., 2013); j) Pérdida de espinas dendríticas en un paciente de Alzheimer (2), comparado con la misma zona paraentorrinal de un sujeto sano (1) (Fuente: Merino-Serrais y col., 2013); k) Cortes histológicos coronales de un cerebro de un paciente de Alzheimer y un sujeto sano; nótese la patente atrofia cortical (1), la dilatación de los ventrículos laterales (2), así como la destrucción de la formación hipocampal (3) en el cerebro del paciente. (Fuente:

<http://marciocandiani.site.med.br/index.asp?PageName=Dem-EAncias>)

4.3 OTROS FACTORES RELACIONADOS CON LA EA

La causa de la EA nos es todavía ignota. Al desconocer tanto el mecanismo de degeneración, como su causa, nos es imposible tratar y prevenir la patología. Las principales causas de la EA que han sido postuladas se resumen en la Tabla 2.

FACTOR DE RIESGO	EFEECTO	REFERENCIAS
Edad	1) Patología de muy larga evolución (20 años) 2) Desde los 60 a los 90 años, su incidencia aumenta exponencialmente 3) Distintas patologías asociadas al envejecimiento favorecen la EA	1) Castellani y col., 2010; Dubois, 2010 2) Nelson y col., 2011 3) Reitz y col., 2011
Diabetes mellitus tipo 2	1) La insulina y el βA compiten por la IDE $\Rightarrow \downarrow$ degradación de βA 2) La insulina regula el procesamiento de la APP 3) Adipocinas y citocinas liberadas favorecen la EA 4) Dobla el riesgo de padecer EA 5) Fármacos antidiabéticos mejoran el deterioro cognitivo	1) Craft, 2007 2) Solano y col., 2000 3) Yu y Ginsberg., 2005 4) Leibson y col., 1997; Luchsinger y col., 2001; Profenno y col., 2009 5) Reitz y col., 2011
Hipertensión arterial	HTA crónica $\Rightarrow \uparrow$ deposición del βA	Kalaria, 2010
Peso corporal	1) Malnutrición $\Rightarrow \uparrow$ EA 2) Obesidad (¿síndrome metabólico?) $\Rightarrow \uparrow$ EA	1) Gustafson y col., 2009 2) Razay y Vreugdenhil., 2005; Profenno y col., 2009; Raffaitin y col., 2009
Traumas encefálicos	1) Demencia pugilística = taupatía + APP + neuroinflamación = EA	Gentleman y col., 1993; McKee y col., 2009
Nivel educativo bajo	1) Escasa formación educativa \Rightarrow desconexiones neurales 2) "Reserva cognitiva" (Cajal) confirmada	1) Bozzali y col., 2014 2) Katzman, 1993
Depresión	Pacientes depresivos tienen más riesgo de padecer EA	Barnes y col., 2001; Becker y col., 2009
Infecciones víricas	1) La infección del citomegalovirus incrementa el riesgo de EA y acelera el deterioro cognitivo 2) Las infecciones con citomegalovirus, virus del herpes, <i>Borrelia burgdorferi</i> y <i>Chlamaydophila penumaniae</i> se asocian con el riesgo de padecer EA 3) Las infecciones con el virus de Epstein-Barr y con el virus del herpes 6 aceleran la progresión de la EA	1) Barnes y col., 2014 2) Bu y col., 2014 3) Carbone y col., 2014

Tabla 2.- Tabla resumen de los distintos factores asociados con la aparición esporádica de la enfermedad de Alzheimer.

EA: Enfermedad de Alzheimer; βA : Péptido β -amiloide; IDE: Enzima degradadora de la insulina; HTA: Hipertensión arterial; APP: Proteína precursora del péptido β -amiloide

Dados los estudios genéticos, cada vez más exhaustivos y popularizados, detallaré más profusamente la **GENÉTICA DE LA EA**.

Aproximadamente, el 95 % de los casos de la EA son esporádicos, idiopáticos y de aparición tardía. Sin embargo, las nuevas técnicas de diagnóstico genético nos permiten identificar determinadas variantes genéticas que incrementan la predisposición a padecer Alzheimer. Así, en un 20-30 % de los casos, la presencia de la isoforma **APOE ε4**⁵⁴ incrementa el riesgo, acelerando la progresión de la enfermedad 6-7 años y promoviendo una mayor severidad (Corder y col., 1993; Strittmatter y col., 1993; Myers y col., 1996; Sabbagh y col., 2013). La APOE transporta colesterol hacia las neuronas, por lo que se le ha propuesto una importante implicación en la sinaptogénesis (Mauch y col., 2001); además, capta péptido βA para su aclaramiento (Kida y col., 1995). La APOE ε4 es especialmente susceptible a su rotura proteolítica (Elliott y col., 2011), lo que altera su función (Bien-Ly y col., 2011) y además, reduce la actividad mitocondrial (Valla y col., 2010; Rohn, 2013), promueve la fosforilación de tau y la formación de ovillos neurofibrilares (Rohn y col., 2012). Por otra parte, el riesgo mediado por la APOE ε4 está asociado con un déficit en el flujo sanguíneo cerebral en las cortezas frontal, parietal y temporal, el cual se advierte antes que la demencia (Thambisetty y col., 2010).

Otros genes candidatos que confieren un cierto riesgo para el desarrollo de Alzheimer de aparición tardía (en Alonso-Vilatela y col., 2012 se puede encontrar una buena revisión), están fundamentalmente implicados en i) el metabolismo del péptido βA⁵: Clusterina (**CLU**⁵⁵), también llamada APOE²⁰ J (Kida y col., 1995; Bell y col., 2007; Harold y col., 2009; Olgiatti y col., 2011), **SORL1**⁵⁶ (Rogaeva y col., 2007; Thinakaran y Koo, 2008; Olgiatti y col., 2011) y **P86L-CALHM1** (Dreses-Werringloer y col., 2008; Lambert y col., 2010); ii) la endocitosis y el reciclaje de membranas: **ABCA7**⁵⁷ (Hollingworth y col., 2011; Tanaka y col., 2011), **PICALM**⁵⁸ (Harold y col., 2009; Dreyling y col., 1996; Olgiatti y col., 2011), **BIN1**⁵⁹ (Elliott y col., 2000; Ren y col., 2006; Olgiatti y col., 2011) y **EXOC3L2**⁶⁰ y iii) la

⁵⁴ APOE ε4: Isoforma ε4 de la Apolipoproteína E

⁵⁵ CLU: Clusterina o apolipoproteína J

⁵⁶ SORL1: Acrónimo inglés "sortilin-related receptor 1", es decir, receptor 1 relacionado con la sortilina

⁵⁷ ABCA7: Del inglés "ATP-binding cassette, subfamily A, member 7"

⁵⁸ PICALM: Acrónimo inglés "phosphatidylinositol binding clathrin assembly", que hace referencia a la proteína de ensamblaje de la clatrina que se une al fosfatidilinositol

⁵⁹ BIN1: Acrónimo inglés "bridging integrator1"

⁶⁰ EXOC3L2: Del inglés "exocyst complex component 3-like2"

neuroinflamación: **TREM2**⁶¹ (Takahashi y col., 2005; Guerreiro y col., 2012; Jonsson y col., 2012).

El 5 % de casos de Alzheimer restante corresponden a formas hereditarias, de aparición temprana. Guardan relación con mutaciones en la APP y en las presenilinas 1 y 2; de ellas, la dominancia autosómica totalmente penetrante solo se alcanza en el 13 % de los casos y la patología puede variar en función del *locus* exacto de la mutación (Patterson y col., 2008). Las 25 mutaciones patogénicas de APP junto a los casos de triplicidad ocurientes en el síndrome de Down (Rumble y col., 1989), las 185 mutaciones autosómicas dominantes de la presenilina 1 y las 12 mutaciones descritas de la presenilina 2 conllevan al incremento en los niveles totales de βA , especialmente de las formas más tóxicas βA_{1-42} o βA_{1-40} (Citron y col., 1997; Hardy, 1997; Cruts y Van Broeckhoven, 1998; Ridge y col., 2013). Por otra parte, las mutaciones en las presenilinas alteran la homeostasia del Ca^{2+} por distintos mecanismos, a saber, *i*) potenciando la salida de Ca^{2+} desde el RE a través de los RIP_3s (Leissring y col., 1999) o de los RRi (Pack-Chung y col., 2000); *ii*) interfiriendo en el rellenado del RE¹ a través de la modulación de la SERCA (Zatti y col., 2004; Giacomello y col., 2005; Zatti y col., 2006; Green y col., 2008; Zampese y col., 2011) o de la entrada capacitativa de Ca^{2+} (Yoo y col., 2000); *iii*) alterando la función de los canales de cationes de baja conductancia que algunos autores creen que conforman en la membrana del RE (Nelson y col., 2007); y *iv*) interaccionando con distintas proteínas quelantes de Ca^{2+} , como la calsenilina (Jin y col., 2005) o la calmirina (Blazejczyk y col., 2006).

Finalmente, hay un mecanismo regulador de la expresión génica que interviene en el desarrollo de la patología: se trata de la *epigenética*. Los mecanismos epigenéticos que favorecen el desarrollo de la EA descritos hasta el momento son: *i*) los **microARNs** (miARNs⁶²): son ARNs endógenos que se unen al ARNm para su degradación o su represión traslacional, de manera que realizan un silenciamiento génico post-transcripcional (Bartel, 2004). Numerosos miRNAs se hallan disregulados en los cerebros de pacientes de Alzheimer, tanto al alza (como miR-34a, miR-181B, miR-9, miR-146a, miR-155 o miR-125b) como a la baja (como el "cluster" miR-29a/b-1, o las familias miR-106 y miR-15), aunque se desconoce su función exacta.

⁶¹ TREM2: Acrónimo inglés "triggering receptor expressed on myeloid cells 2" que designa al receptor activador 2 expresado en las células mieloides

⁶² miRNAs: microRNAs, secuencias no codificadoras del ácido ribonucleico

Algunos de estos miRNAs regulan la expresión de la APP, de las presenilinas o la fosforilación de tau (Lukiw, 2007; Maciotta y col., 2013). Por ejemplo, los niveles de miR-125b en los cerebros de pacientes doblan los de los individuos sanos, lo que desequilibra las actividades cinasa-fosfatasa en el cerebro, promoviendo la hiperfosforilación de tau, y conllevando a alteraciones en la memoria y aprendizaje de ratones (Banzhaf-Strathmann y col., 2014); y, *ii*) la **hipermetilación del ADN**, suele conllevar un silenciamiento de los genes. En los cerebros de pacientes de Alzheimer, incluso presintomáticos, aparece un patrón de metilación alterado; así, se han descrito varios genes hipermetilados (De Jager y col., 2014), entre los que destaca el gen de la anquirina 1 (ANK1⁶³), que aparece hipermetilado en el córtex entorrinal, el giro temporal superior y el córtex prefrontal, pero no así en el cerebelo o en sangre periférica (Lunnon y col., 2014).

Una de las dificultades que presenta el estudio del epigenoma es la necesidad de realizarse en tejido post mórtem.

4.4 CLÍNICA Y TERAPÉUTICA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Una característica de la EA es la dificultad de su diagnóstico, debido a la disparidad de la sintomatología, tanto interindividual, como a lo largo de la evolución de la patología. Así pues, para establecer el diagnóstico, es preciso valorar la historia médica del paciente y la exploración clínica y realizar tests neuropsicológicos y pruebas bioquímicas.

Aunque no es posible determinar las características histopatológicas de la patología en vida, las nuevas técnicas de neuroimagen permiten analizar el metabolismo neuronal (Golby y col., 2005; Fiandaca y col., 2014), la perfusión cerebral (Alsop y col., 2000), la distribución del péptido β A (Klunk y col., 2004) o los procesos de neuroinflamación (Tomasi y col., 2008), entre otros (Fig. 8).

Por otra parte, la determinación de los niveles de péptido β A₁₋₄₂ / péptido β A₁₋₄₀ o de tau hiperfosforilada, tanto en sangre periférica, como en el LCR o diversos estudios genéticos pueden servir como biomarcadores de la patología.

⁶³ ANK1: Anquirina 1, del inglés "ankyrin 1"

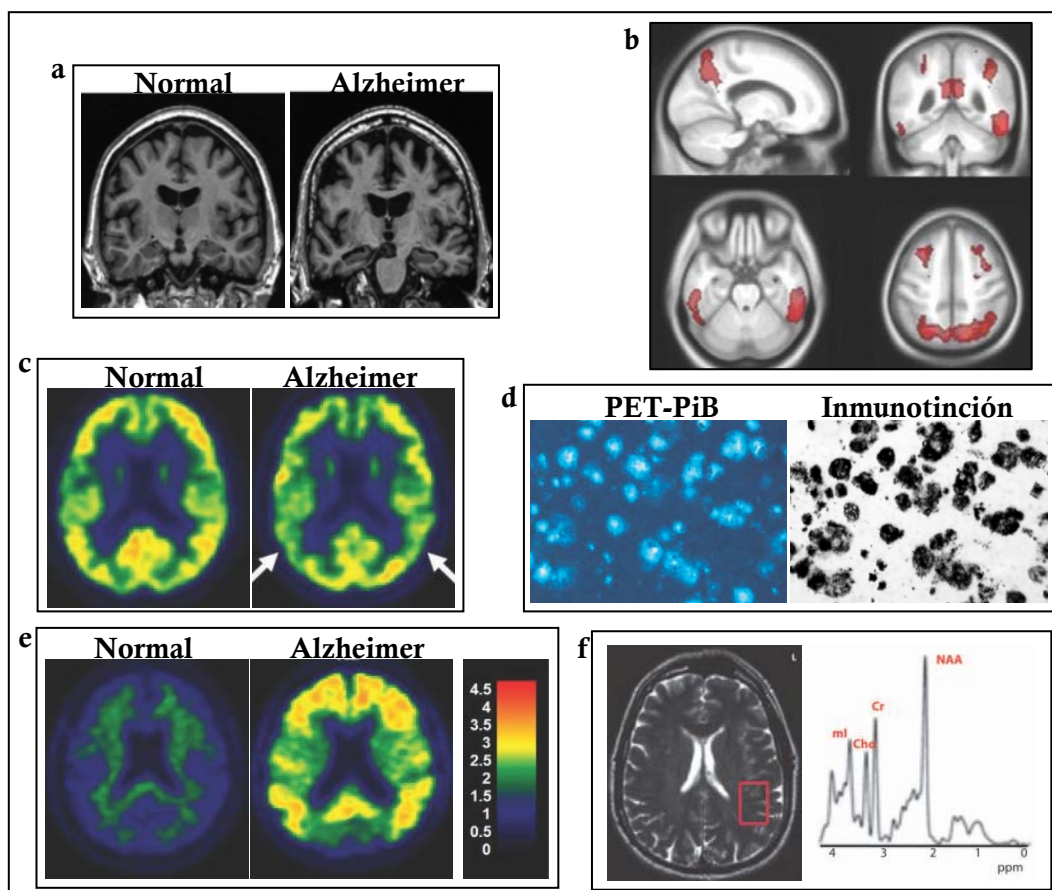


Fig. 8.- Diagnóstico por imagen de la enfermedad de Alzheimer.

Resonancia magnética estructural para apreciar la atrofia (a) y la hipoperfusión (b, áreas rojas); c) Tomografía por emisión de positrones (PET) donde se aprecia una disminución del metabolismo, en especial en las áreas señaladas con las flechas; d) Placas seniles marcadas con el trazador Compuesto B de Pittsburg (PiB) y su correlación inmunohistoquímica; e) Carga amiloidea tomada con PiB-PET; f) Registro de resonancia magnética espectroscópica; el mioInositol (mI) y el N-Acetil-Aspartato (NAA) se elevan en el Alzheimer.

Fuentes: a,b,c,d,e: Jack, 2012; d: Ikonomic y col., 2008; f: Ortiz-Terán y col., 2011

En la actualidad, aún somos incapaces no ya de curar la EA, sino siquiera de decelerar la progresión de la neurodegeneración (Krstic y Knuesel, 2013). Ello, pese a la ingente cantidad de dinero invertida en más de 102.000 publicaciones, más de 1.200 ensayos clínicos (a modo de curiosidad, véase en la Fig. 9 la distribución geográfica de los mismos) y el desarrollo de innovadores fármacos.

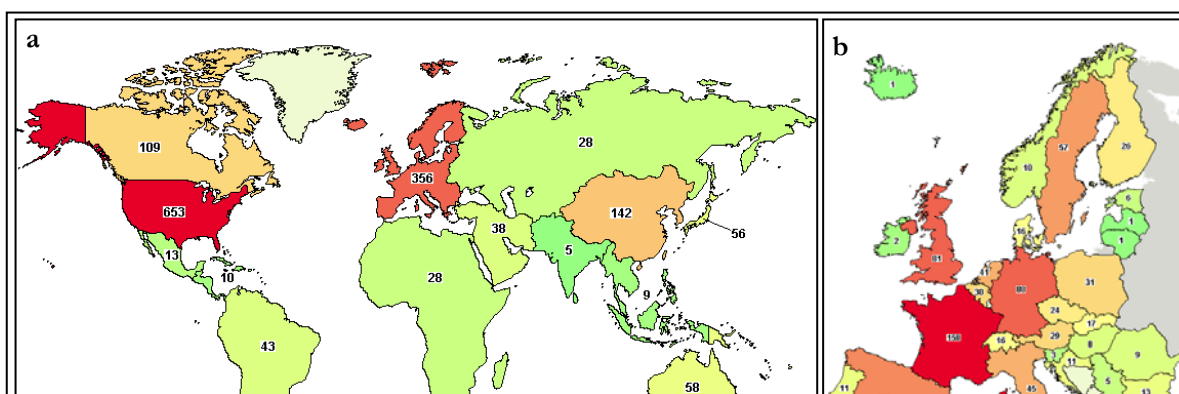


Fig. 9.- Localización geográfica de los ensayos clínicos realizados hasta 2014 para la enfermedad de Alzheimer.

a) Distribución mundial; b) Distribución en Europa.

Las cifras dentro de cada país muestran el número de ensayos clínicos realizados o en realización.

Fuente: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Alzheimer+Disease>

En la actualidad, se están desarrollando estrategias muy diversas, como el empleo de neurotrofinas (Tuszynski y col., 2005; 2007), antioxidantes (Taguidazed y col., 2014), inmunoterapia anti- β A (Schenk y col., 1999; Castellani y col., 2010; Salloway y col., 2014) o inhibidores de las secretasas, aunque en ocasiones se han tenido resultados muy negativos (Orgogozo y col., 2003; Gilman y col., 2005; <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00594568?intr=ly+450139&rank=1>).

En la práctica clínica, se están llevando a cabo dos estrategias terapéuticas, basadas en la paliación de la sintomatología,:

4.4.1 FÁRMACOS COLINÉRGICOS: Dada la neurodegeneración colinérgica, a lo largo de los últimos 20 años se ha intentado estimular el sistema colinérgico mediante el empleo de inhibidores de la AChE, precursores de colina, agonistas muscarínicos o agonistas nicotínicos; ello ha demostrado estabilizar el deterioro cognitivo de 3 a 6 meses, aunque no modifican el curso de la patología (Whitehouse, 1993; Giacobini 2002). Los inhibidores de la AChE (Fig. 10) son la mejor terapia hasta el momento para tratar la EA leve a moderada. Se cree que estos fármacos incrementan la ACh en la hendidura sináptica, por un lado, y, por otro, y quizás más importante, disminuyen la producción de compuestos amiloidogénicos como el β A (Mori y col., 1995). La tacrina (comercializado por la compañía Parke-Davis bajo el nombre de Cognex) fue el primer anticolinesterásico utilizado, a raíz de un ensayo clínico en el que se demostró que mejoraba la función cognitiva (Knapp y col., 1994); ensayos posteriores no han demostrado tan buena eficacia. La corta vida media y efectos adversos colinérgicos, fundamentalmente a nivel gastrointestinal,

especialmente la inducción de hepatotoxicidad han limitado su uso (Summers, 2006). La segunda generación de anticolinesterásicos como el donepezilo (de Pfizer cuyo nombre comercial es Aricept), la galantamina (de Janssen-Cilag, bajo la denominación Reminyl) o la rivastigmina (comercializado por Novartis -Exelon- y Laboratorios Dr. Esteve -Prometax-) presentan vidas medias más largas, efectos secundarios menos graves y una mayor eficacia, en especial la rivastigmina, por ser además un inhibidor de la butirilcolinesterasa (enzima que supone un 10% de la actividad colinesterásica cerebral total) (Trinh y col., 2003)

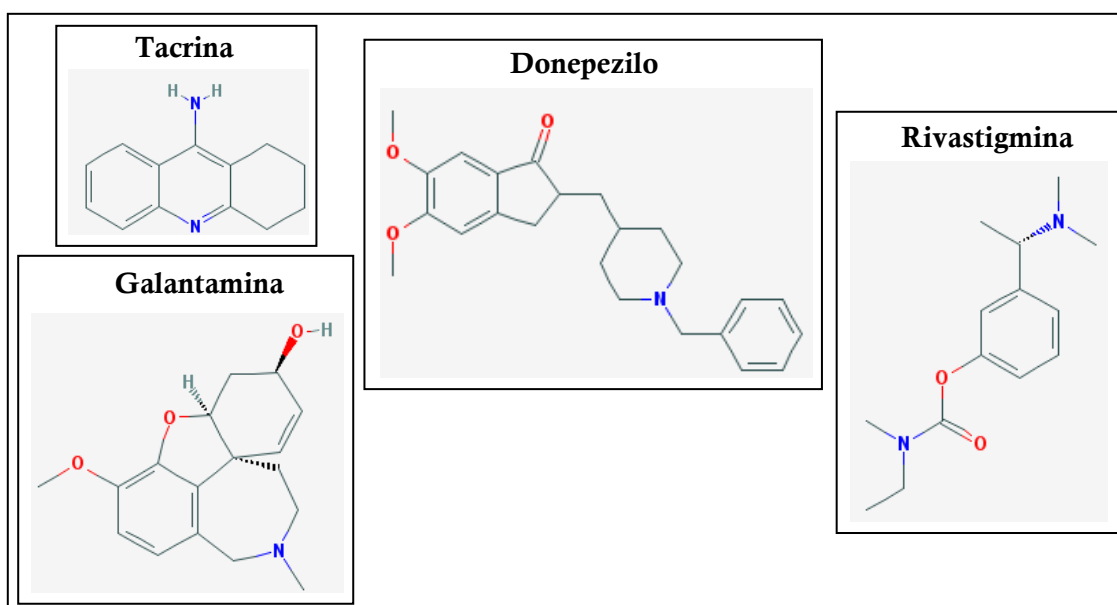


Fig. 10.- Fórmulas moleculares de los distintos inhibidores de acetilcolinesterasa.

Fuente: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

4.4.2 BLOQUEANTES DE LA EXCITOTOXICIDAD: Dado que en la enfermedad de Alzheimer se desarrollan mecanismos de excitotoxicidad, una de las posibles estrategias neuroprotectoras podría ser evitar la sobre-activación de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA. Para ello, se ha desarrollado la memantina (Fig. 11), un antagonista no competitivo de baja afinidad de los receptores NMDA, lo que permite la activación del canal solo en condiciones fisiológicas de neurotransmisión (Misztal y col., 1996). A diferencia de los inhibidores de la AChE, que se prescriben en etapas iniciales de la EA, el uso de la memantina está aprobado para avanzados estados de la patología. No obstante, los datos clínicos de este fármaco son muy controvertidos (Reisberg y

col., 2003; Van Dyck y col., 2007); de hecho, una revisión sistemática Cochrane de todos los ensayos clínicos realizados hasta el momento ha determinado que la memantina solo ofrece pequeños beneficios a los 6 meses de tratamiento (McShane y col., 2006). Sin embargo, la combinación de memantina con donepezilo puede ser mucho más beneficiosa (Tariot y col., 2004).

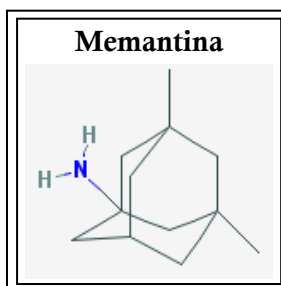


Fig. 11.- **Fórmula molecular de la memantina.**

Fuente: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

El fracaso terapéutico en la EA puede ser debido a distintos factores, como *i*) estar errando en la diana terapéutica (el β A, por ejemplo) (Rosemblum, 2014); *ii*) buscar mecanismos de acción que resultan tóxicos (disolver placas seniles en oligómeros de β A); *iii*) utilización de modelos animales poco representativos de la patología; *iv*) afrontar la patología en estadios excesivamente avanzados; *v*) ausencia en la normalización de protocolos diagnósticos y de investigación clínica (por ejemplo, no se hacen autopsias a los voluntarios de los ensayos clínicos), entre otros.

4.6. P86L-CALHM1: UN NUEVO AGENTE IMPLICADO EN LA ETIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La EA es, pese a todo lo descrito anteriormente, una gran desconocida. Es, por ello, imprescindible seguir estudiando el origen y los mecanismos exactos de neurodegeneración, con el fin de encontrar terapias efectivas. Uno de los elementos que ha sido recientemente implicado, al menos parcialmente, en la etiopatogenia de la EA es el polimorfismo P86L del canal CALHM1 (P86L-CALHM1).

4.5.1 ESTRUCTURA DE CALHM1

CALHM1 (acrónimo inglés de "CALcium Homeostasis Modulator 1"), antes llamado FAM26C, es un gen localizado en el cromosoma 10 en el *locus* 10q24.33 (Fig. 12). Está formado por dos exones, el primero de los cuales se halla hipermetilado. Codifica una región de lectura abierta (ORF⁶⁴, del inglés "Open Reading Frame") de 346 aminoácidos, que, probablemente, contiene 4 dominios hidrofóbicos transmembranales (TM⁶⁵) y dos motivos de N-glicosilación. CALHM1 es un gen muy conservado evolutivamente, pues se puede encontrar en, al menos, 20 especies, incluyendo al nematodo *Caenorhabditis elegans* (Maupas) (en adelante, *C. elegans*⁶⁶), al pez cebra, al ratón, al chimpancé y al humano (Dreses-Werringloer y col., 2008; Wu y col., 2012).

CALHM1 codifica una nueva proteína cuya expresión se describió en un primer momento restringida al hipocampo. En el ser humano, se han identificado 6 genes homólogos a CALHM1 que componen la familia génica FAM26, las cuales presentan un patrón de expresión distinto y pueden modificarse post-transcripcionalmente; de ellas, CALHM2 (antes llamado FAM26B) y CALHM3 (antes llamado FAM26A) (con un 26 % y un 39 % de identidad en la secuencia con CALHM1, respectivamente) se localizan en un agrupamiento génico en tándem (también llamado "cluster", del inglés) adyacente al *locus* 10q24.33 y su expresión proteica es ubicua. Se ha demostrado que CALHM1 no sólo aparece en el hipocampo, sino en todos los tejidos nerviosos analizados. Curiosamente, se advierten bajos niveles de expresión en otros tejidos, tales como cerebro fetal, pulmón, próstata, testículos, timo o tráquea (Dreses-Werringloer y col., 2008; Siebert y col., 2013). En *C. elegans*, el patrón de expresión es similar, pues aparece en células excitables, tales como neuronas sensoriales, músculo, y espermateca (Tanis y col., 2013). Además, se ha inferido que CALHM1 es una proteína de origen neuronal, puesto que para detectarla, es preciso diferenciar hacia fenotipo neuronal a la línea celular de neuroblastoma humano, SH-SY5Y⁶⁷, con ácido retinoico, dado que en estado

⁶⁴ ORF: "Open Reading Frame", región génica de lectura abierta

⁶⁵ TM: Transmembranal (dominio)

⁶⁶ *C. elegans*: Nematodo *Caenorhabditis elegans* (Maupas)

⁶⁷ SH-SY5Y: Línea celular de neuroblastoma humana

indiferenciado no se hace patente (datos no mostrados; Dreses-Werringloer y col., 2008).

CALHM1 se localiza fundamentalmente en el RE, aunque parece haber una pequeña fracción en la membrana plasmática; ello fue confirmado porque: *i*) CALHM1 es parcialmente resistente a la endoglicosidasa H, adquiriéndose dicha resistencia en el aparato de Golgi, durante su procesamiento hacia la membrana plasmática; *ii*) CALHM1 se biotinila (Dreses-Werringloer y col., 2008); *iii*) en ovocitos de *Xenopus laevis* (Daudin) (en adelante, *Xenopus*⁶⁸) a los que se ha inyectado ARNm de CALHM1 acoplado a una proteína fluorescente verde (GFP⁶⁹) o el homólogo CHLM-1⁷⁰, se expresa una proteína de membrana (Ma y col., 2012; Tanis y col., 2013); y, *iv*) en *C. elegans* se localiza en la membrana plasmática de músculos, próximo a las uniones celulares y a regiones sinápticas (Tanis y col., 2013).

La primera predicción de la distribución topológica de CALHM1¹ fue que su dominio carboxi-terminal era extracelular y que constaba de tres dominios TM⁵ capaces de cruzar la bicapa lipídica; entre el 2º y el 3º dominio TM se encontraba un dominio que conformaba un bucle, al insertarse solamente en una monocapa, y en el que se localizaba la asparagina N140, susceptible de N-glicosilación extracelular (Fig. 12c). Por otra parte, se comprobó que esta proteína, cuya masa molecular es de unos 40 kDa, era capaz de homomultimerizar conformando dímeros y tetrámeros (Dreses-Werringloer y col., 2008). Estudios posteriores han demostrado, sin embargo, que los multímeros de CALHM1 son, en realidad, hexámeros formados por una proteína que presenta 4 dominios TM, con los dominios amino y carboxi-terminales intracelulares y que conforman un poro de gran tamaño (estimado en 14 Armstrongs), lo que les hace ser similares estructuralmente a los hemicanales conformados por conexinas y panexinas (Siebert y col., 2013).

La estructura de CALHM1 apunta claramente a la de un canal de Ca²⁺: en un primer momento, se creía que guardaba alguna relación con el receptor glutamatérgico de tipo NMDA, pero una vez descartado, por no responder a pulsos de glutamato 100 µM y carecer de similaridad estructural con la región del poro del mismo, (Dreses-Werringloer y col., 2008; Ma y col., 2012; datos no mostrados), se postuló que estaba relacionado con los canales de conexinas; sin embargo, CALHM1 no forma uniones

⁶⁸ *Xenopus*: Rana africana de uñas *Xenopus laevis* (Daudin)

⁶⁹ GFP: Acrónimo inglés "Green Fluorescent Protein" que define a la proteína fluorescente verde

⁷⁰ CHLM-1: Homólogo de CALHM1 en *C. elegans*

estrechas y no es bloqueado por los moduladores de este tipo de canales (Siebert y col., 2013). CALHM1, por tanto, es un nuevo canal de Ca^{2+} con características estructurales únicas.

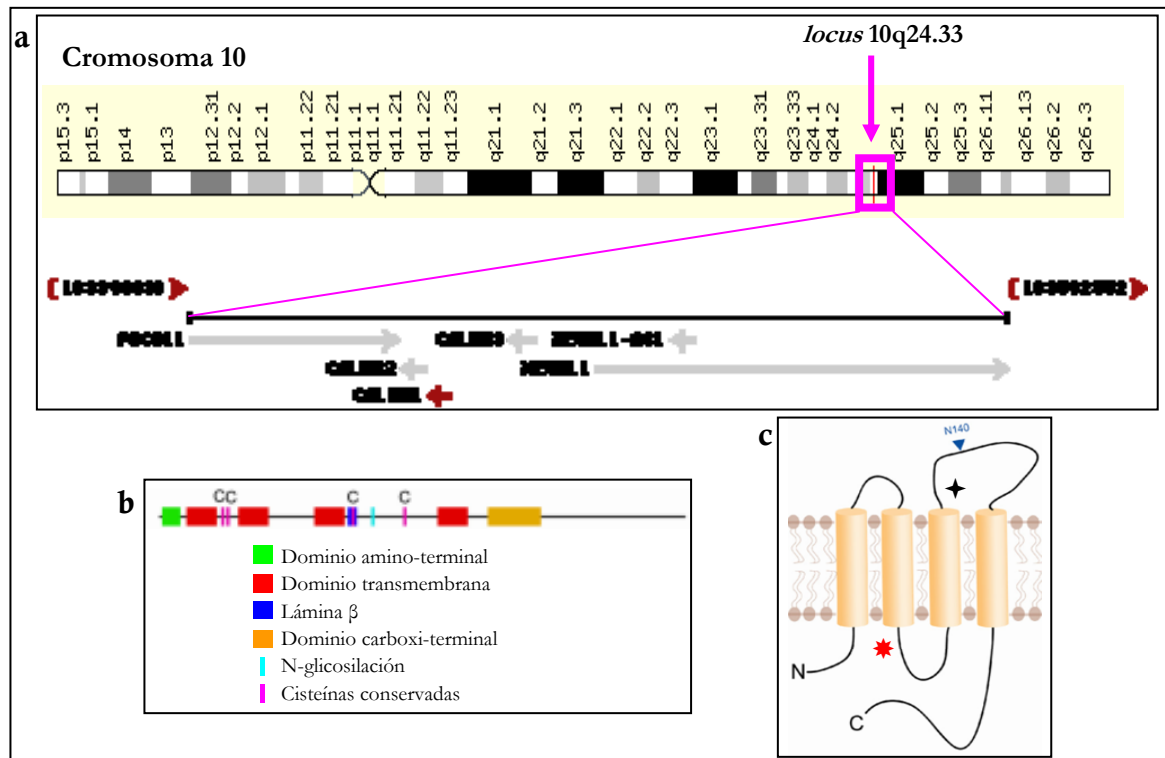


Fig. 12.- Estructura de CALHM1.

a) Localización cromosómica de CALHM1; b) Probable estructura molecular de CALHM1, basada en su secuencia de aminoácidos; c) Posible distribución topológica de CALHM1; se destacan el dominio N140 susceptible de N-glicosilación; la localización del dominio selectivo del poro (★), así como el lugar aproximado del codón 86 donde muta la prolina a leucina (*).

Fuentes: a) NCBI:[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=%28calhm1\[gene\]%29%20AND%20%28Homo%20sapiens\[orgn\]%29%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=%28calhm1[gene]%29%20AND%20%28Homo%20sapiens[orgn]%29%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight); b) y c) Modificado de Siebert y col., 2013

4.5.2 PROPIEDADES ELÉCTRICAS Y DE PERMEABILIDAD DE CALHM1

Uno de los mejores métodos para estudiar los canales iónicos consiste en inyectar el ARNm del canal de interés en ovocitos de *Xenopus* y, una vez expresada la proteína, realizar medidas de corrientes o de voltaje mediante la técnica electrofisiológica de "patch clamp" (Neher y Sakmann, 1976; Hamill y col., 1981). En el artículo del grupo del Dr. Philippe Marambaud en el que se describió por primera vez CALHM1, se realizaron medidas de corrientes en ovocitos de *Xenopus* y en células

no excitables CHO⁷¹ que expresaban CALHM1, aunque no se estudiaron con mucha más profundidad las propiedades de conductancia, permeabilidad y probabilidad de apertura (Dreses-Werringloer y col., 2008). En el siguiente artículo en el que se describe pormenorizadamente el canal de CALHM1, publicado por el grupo del Prof. Kevin Foskett, se hizo hincapié en el estudio de tales propiedades. Se sabe que la expresión de CALHM1 en ovocitos de *Xenopus* en condiciones despolarizantes genera unas corrientes que se activan lentamente y se inactivan a voltajes hiperpolarizantes de - 80 mV; estos resultados fueron similares a los obtenidos en células de neuroblastoma de ratón N2a⁷² transfectadas con CALHM1, lo que confirma que CALHM1 es un canal de membrana plasmática con una cierta dependencia de voltaje. Posteriormente, analizaron las permeabilidades relativas (P_s^{73}) de iones y estimaron que CALHM1 es permeable al Ca^{2+} , cationes monovalentes y Cl^- , con una selectividad tal que $Ca^{2+} \gg Na^+ \approx K^+ > Cl^-$. Además, determinaron, mediante mutaciones selectivas en la asparagina 121, que el extremo extracelular de la 3ª región TM confiere la selectividad al poro iónico de CALHM1⁵¹ (Ma y col., 2012). Asimismo, la N-glicosilación de la asparagina 140 (N140) es imprescindible para que CALHM1 permee Ca^{2+} (Dreses-Werringloer y col., 2013). Por su parte, CHLM-1⁷⁰ es la proteína homóloga a CALHM1 humano en *C. elegans*, aunque solo son idénticas en un 16% y similares en un 28%; pese a ello, comparten las mismas propiedades de estructura, conductancia y permeabilidad del canal iónico, aunque difieren ligeramente en cuanto a su regulación (Tanis y col., 2013), lo que confirma la existencia y funcionalidad fisiológicas de CALHM1.

Desde el descubrimiento de CALHM1, se evidenció que el protocolo de reintroducción de Ca^{2+} activaba al canal (Dreses-Werringloer y col., 2008), mientras que las concentraciones fisiológicas de cationes divalentes producían corrientes de rectificación (Ma y col., 2012). El protocolo de reintroducción de Ca^{2+} , en el que se retira el Ca^{2+} extracelular y después se añade una concentración fisiológica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]^{74}$) a la solución extracelular, genera un gran incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en las células que expresan CALHM1; ello ocurre en todos los modelos celulares empleados

⁷¹ CHO: Acrónimo inglés de "Chinese Hamster Ovary" que designa a la línea celular no excitable procedente de ovario de hámster chino

⁷² N2a: Línea celular de neuroblastoma de ratón

⁷³ P: Permeabilidad

⁷⁴ $[Ca^{2+}]$: Concentración de Ca^{2+}

hasta el momento: hipocampo de ratón HT22⁷⁵ (Dreses-Werringloer y col., 2008; Dreses-Werringloer y col., 2013), feocromocitoma de rata PC12⁷⁶ (Dreses-Werringloer y col., 2008; Ma y col., 2012), neuroblastoma de ratón N2a (Dreses-Werringloer y col., 2008; Ma y col., 2012), riñón de embrión humano HEK-293⁷⁷ (Dreses-Werringloer y col., 2008; Gallego-Sandín y col., 2011), carcinoma de cérvix humano HeLa⁷⁸ (Moreno-Ortega y col., 2010) y neuroblastoma humano SH-SY5Y (Dreses-Werringloer y col., 2008), y es debido a que la $[Ca^{2+}]^{74}$ extracelular regula muy finamente a CALHM1. De hecho, en experimentos en los que se mantiene la carga de la membrana y sólo se varían las $[Ca^{2+}]^{74}$ extracelulares, demostraron que la $[Ca^{2+}]$ extracelular "per se" es la base biofísica de la apertura de CALHM1 (Ma y col., 2012). Dado que en células de neuroblastoma N2a se obtienen resultados similares, se puede deducir que la regulación de CALHM1 por el voltaje y por la $[Ca^{2+}]$ extracelular es universal.

Por su parte, al realizar relaciones de conductancia-voltaje, en ausencia de cationes divalentes, en ovocitos de *Xenopus* que expresan CALHM1, se advierte que la probabilidad de apertura de CALHM1 es dependiente de voltaje "per se". Además, la regulación mediada por Ca^{2+} es completamente dependiente de voltaje, pues para que las altas $[Ca^{2+}]$ extracelular cierren el canal, es indispensable una hiperpolarización de la membrana (Fig. 13); ello puede ser debido a que la conformación de los sitios de unión al Ca^{2+} sea dependiente de voltaje. Por tanto, las altas $[Ca^{2+}]$ extracelular, junto a la hiperpolarización de la membrana, incrementan la probabilidad de cierre de CALHM1 estabilizando el canal en el estado cerrado, lo que sugiere que los sensores del Ca^{2+} extracelular y el voltaje de membrana están acoplados alostéricamente para regular a CALHM1 (Ma y col., 2012). Esta regulación es ligeramente distinta a la del CLHM-1 de *C. elegans*, aunque se mantiene su dependencia al voltaje y a la $[Ca^{2+}]$ extracelular (Tanis y col., 2013).

En resumen, CALHM1 se regula por voltaje y por Ca^{2+} extracelular, de manera que la probabilidad de apertura de CALHM1 se incrementa cuando la célula está despolarizada y cuando la $[Ca^{2+}]$ extracelular es muy reducida, mientras que la probabilidad de cierre se acrecienta cuando se aumenta la $[Ca^{2+}]$ extracelular y se hiperpolariza la membrana plasmática (Ma y col., 2012). En condiciones de actividad

⁷⁵ HT22: Línea celular de hipocampo de ratón

⁷⁶ PC12: Línea celular de feocromocitoma de rata

⁷⁷ HEK-293: Línea celular de riñón de embrión humano

⁷⁸ HeLa: Línea celular no excitable procedente de un carcinoma de cérvix de la Sra. Henrietta Lacks

sináptica excitatoria muy alta, la $[Ca^{2+}]$ extracelular a nivel muy local, en la proximidad de los receptores de glutamato tipo NMDA y de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV⁷⁹), el Ca^{2+} puede llegar a desaparecer transitoriamente (Rusakov y Fine, 2003), aunque se aprecian grandes incrementos en los niveles intracelulares de Ca^{2+} , situación que se ha venido a llamar "la paradoja del Ca^{2+} "; puede que en estas condiciones de alta actividad sináptica, CALHM1 actúe para amplificar la neurotransmisión o para mediar neurodegeneración por excitotoxicidad (Burgo y col., 2003; Desphande y col., 2007; Ma y col., 2012).

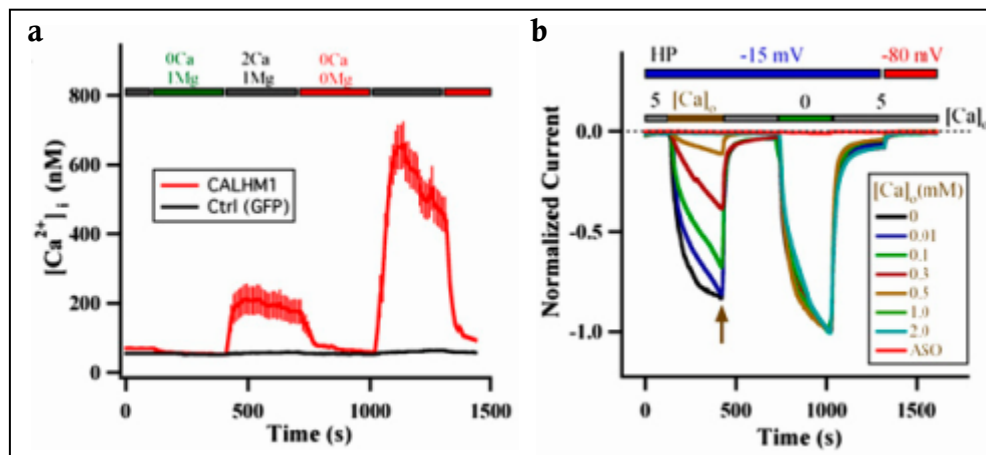


Fig.13.- Regulación de CALHM1 por el voltaje de membrana y por la $[Ca^{2+}]$ extracelular.

a) Registros de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en células de neuroblastoma de ratón N2a transfectadas con CALHM1 o GFP. Los protocolos de reintroducción de Ca^{2+} incrementan la $[Ca^{2+}]_i$. b) Registros de corrientes en ovocitos de *Xenopus*⁶⁸ transfectados con CALHM1. La reducción de $[Ca^{2+}]$ extracelular ($[Ca^{2+}]_o$) en condiciones despolarizantes (-15 mV) genera corrientes de entrada, que son completamente abolidas al hiperpolarizar la membrana (-80 mV) o incrementar la $[Ca^{2+}]_o$ a 5 mM.

Fuente: Ma y col., 2012

Se ha comprobado que la reducción de la $[Ca^{2+}]$ extracelular produce en las neuronas de hipocampo un incremento en la excitabilidad neuronal; sin embargo, en neuronas hipocámpales procedentes de un ratón nulo para CALHM1 la conductancia de la membrana se reduce, y las neuronas no muestran en absoluto tal incremento en la excitabilidad, por lo que al delecionar el CALHM1, obtenemos un fenotipo neuronal en el que la excitabilidad de membrana es menor y las respuestas a los estímulos son tónicas en vez de fásicas (Fig. 14; Ma y col., 2012). Dicho fenotipo tiene consecuencias fisiológicas claras, pues delecionar el homólogo CHLM-1 de *C. elegans*

⁷⁹ CCDV: Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

conlleva alteraciones en la neurotransmisión que regula la locomoción, de manera que los nematodos nulos a CHLM-1 presentan una locomoción descoordinada (Tanis y col., 2013). Sin embargo, la delección de CALHM1 en los ratones no parecer desencadenar consecuencias fatales, pues éstos se presentan sanos, fértiles y sin alteraciones cognitivas (Ma y col., 2012; Wu y col., 2012).

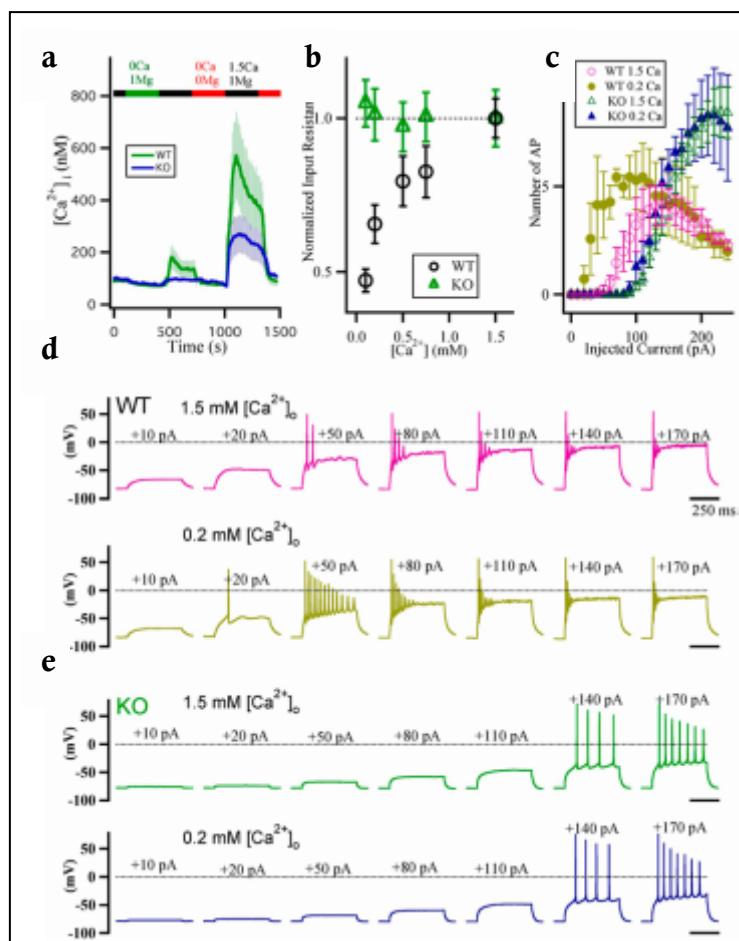


Fig.14.- Papel regulador de CALHM1 en la excitabilidad de la membrana.
a) Registros de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) obtenidos al realizar protocolos de reintroducción de Ca^{2+} en neuronas de hipocampo procedentes de un ratón silvestre (WT) o nulo para CALHM1 (KO); b) La delección de CALHM1 reduce la resistencia de la membrana plasmática; c) Las neuronas hipocámpales del ratón nulo de CALHM1 deben ser excitadas con una mayor corriente para que generen potenciales de acción; Registros de potencial de membrana de neuronas hipocámpales del ratón silvestre (d) o nulo para CALHM1 (e); para que las células del ratón delecionado respondan, es preciso inyectar mucha más corriente, obteniéndose respuestas tónicas en vez de las típicas fásicas de las neuronas control.

Fuente: Ma y col., 2012

En resumen, CALHM1 es un nuevo canal iónico regulado por Ca^{2+} y por voltaje que media, de manera fisiológica, la excitabilidad neuronal a bajas $[Ca^{2+}]$ extracelular. La cinética de este canal de Ca^{2+} genera un incremento sostenido en el tiempo de la $[Ca^{2+}]_{cit}$. Estos niveles de $[Ca^{2+}]_{cit}$ no son citotóxicos en las líneas

celulares HT22, CHO, PC12, HEK-293, HeLa, N2a y SH-SY5Y (Dreses-Werringloer y col., 2008; Moreno-Ortega y col., 2010; Gallego-Sandín y col., 2011; Ma y col., 2012). Por otra parte, el Ca^{2+} que permea CALHM1 induce el procesamiento proteolítico de la APP a través de la α -secretasa, reduciéndose los niveles de βA , (Dreses-Werringloer y col., 2008).

4.5.3 PAPEL FISIOLÓGICO DE CALHM1

En 2009, el grupo de Albert Zlotnik describió la expresión de CALHM1 en las papilas gustativas positivas para TRPM5⁸⁰, que son las responsables de la transducción de los sabores dulce, amargo y umami, en ratón, en macaco y en humano; dicha transducción es dependiente de Ca^{2+} (Moyer y col., 2009) y el neurotransmisor implicado es el ATP (Finger y col., 2005). Posteriormente, Taruno y col describieron que el ratón nulo para CALHM1 no reaccionaba frente a la presentación de compuestos dulces, amargos o umamis (Taruno y col., 2013a) y, después, muy salados (Tordoff y col., 2014). Por otra parte, se ha demostrado que los protocolos de reintroducción de Ca^{2+} , en los que se activa el canal, generan una liberación de ATP a su través en células HeLa, Cos1⁸¹ y en ovocitos de *Xenopus* que expresan CALHM1; tal liberación de ATP es inhibida por el bloqueante de CALHM1 rojo rutenio. Al igual que ocurre con las propiedades de CALHM1 como canal de Ca^{2+} , la liberación de ATP ocurre cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular es baja y cuando las células se hallan despolarizadas; sin embargo, en las papilas gustativas tipo II del ratón delecionado para CALHM1 no se produce tal liberación de ATP. Por tanto, CALHM1 tiene un papel fundamental en la transducción del gusto, al ser, probablemente, el elemento que libera el ATP excitador a la neurona aferente (Taruno y col., 2013a).

El procesamiento del gusto (Fig. 15) comienza cuando una molécula de sabor es detectada en los "microvilli" apicales de las papilas gustativas por un receptor de membrana acoplado a una proteína G (en adelante, GPCR⁸²) que contiene la subunidad α de la proteína G GNAT3 (también llamada gustducina). La proteína G

⁸⁰ TRPM5: Acrónimo inglés de "Transient Receptor Potential cation channel subfamily M member 5", es decir, un canal de cationes dependiente de transientes de Ca^{2+}

⁸¹ Cos1: Línea celular cuyo acrónimo inglés es "CV-1 (simio) in Origin and carrying the SV40 genetic material 1")

⁸² GPCR: Receptor de membrana acoplado a proteína G

activa a la fosfolipasa C- β 2, la cual libera IP_3 desde los fosfolípidos de membrana. Los IP_3 3, una vez activados por el IP_3 , liberan Ca^{2+} del RE, lo que a su vez activa a los canales TRPM5; éstos generan una señal de Ca^{2+} muy rápida que despolariza la membrana.

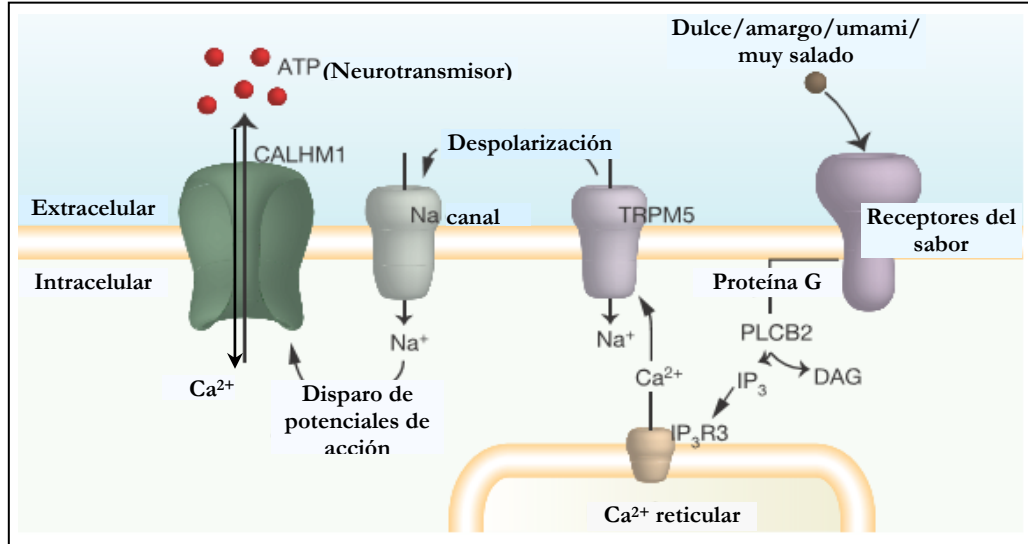


Fig. 15.-Probable mecanismo transducción del gusto en las células positivas a TRPM5⁸⁰.

Las moléculas gustativas son captadas por su receptor acoplado a una proteína G cuya activación induce la formación de IP_3 ³⁴ a través de la fosfolipasa C PLC β 2. El IP_3 ³⁴ provoca la salida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, lo que activa al canal TRPM5⁸⁰, el cual despolariza a la célula. Canales de Na^+ dependientes de voltaje provocan una fuerte despolarización a la célula, lo que promueve la activación de CALHM1⁵¹. CALHM1⁵¹ permea Ca^{2+} al interior celular y libera ATP hacia el exterior celular, el cual será captado por la neurona aferente purinérgica.

Fuente: Modificado de Taruno y col., 2013a.

Esta despolarización podría activar una serie de canales de Na^+ dependientes de voltaje (SCN2A (Nav1.2), 3A (Nav1.3), 9A (Nav1.7)) que mediante la internalización de Na^+ , amplificaría notablemente la despolarización de membrana. En estas condiciones, CALHM1 puede verse activado y mediar tanto la entrada de Ca^{2+} , que podría amplificar el mecanismo de transducción, como la salida de ATP. Este ATP es captado por los receptores purinérgicos P2X2 y P2X3 de la neurona aferente, encargada de transmitir la señal del gusto, así transducida, al sistema nervioso central (Taruno y col., 2013a; Taruno y col., 2013b).

4.5.4 FARMACOLOGÍA DEL CANAL CALHM1

Al ser CALHM1 un nuevo canal de Ca^{2+} con propiedades excepcionalmente distintas, se ha estudiado profusamente su farmacología. Se han empleado distintos fármacos, tanto para CALHM1 como para su homólogo CLHM-1, obteniéndose los resultados siguientes:

- los bloqueantes inespecíficos de los CCDV y del canal capacitativo de Ca^{2+} , tales como los metales Gd^{3+} (100 μM), Co^{2+} (50 μM), Zn^{2+} (20 μM ; 100 μM en *C. elegans*) o Ni^{2+} (10 μM) bloquearon totalmente el canal (Dreses-Werringloer y col., 2008; Ma y col., 2012; Siebert y col., 2013; Tanis y col., 2013; datos de la presente memoria)
- los inhibidores de la entrada capacitativa de Ca^{2+} , como el borato de 2-aminoetoxidifenilo (2-APB⁸³) a 50 μM no bloquearon el canal (Dreses-Werringloer y col., 2008). Sin embargo, 1 mM de 2-APB consiguió bloquear CALHM1 parcialmente (Ma y col., 2012), aunque este comportamiento no pudo ser observado en el CLHM-1 (Tanis y col., 2013). Es preciso hacer notar que el 2-APB, descrito en un primer momento como bloqueante de los RIP_3s , a altas concentraciones, pierde completamente su especificidad, llegando a bloquear los canales responsables de la entrada capacitativa de Ca^{2+} , la SERCA o el mNCX (Peppiatt y col., 2003)
- los bloqueantes de los CCDV, tales como SNX-482 (0,5 μM ; tipo R), mibefradilo (1 μM ; tipo T), nifedipino (10 μM y 100 μM ; tipo L), nimodipino (10 μM ; tipo L), verapamilo (1 mM; tipo L) u ω -conotoxina MVIIC (5 μM ; tipos N, P, Q) no modularon al canal, incluso a concentraciones muy elevadas (Dreses-Werringloer y col., 2008; Ma y col., 2012; Tanis y col., 2013)
- el bloqueante de los canales de Na^+ dependientes de voltaje por excelencia, TTX⁸⁴ (10 μM) no tuvo ningún efecto (Ma y col., 2012)
- el bloqueante de los canales de K^+ dependientes de voltaje TEA⁸⁵ no moduló CALHM1⁵¹ (Ma y col., 2012)
- el bloqueante de los canales de Cl^- ácido flufenámico (200 μM) no ejerció ningún efecto, mientras que el bloqueante ácido niflúmico (200 μM), estimuló ligeramente la corriente de CALHM1 (Ma y col., 2012)

⁸³ 2-APB: Borato de 2-aminoetoxidifenilo (del inglés "2-AminoethoxydiPhenyl Borate")

⁸⁴ TTX: Tetrodotoxina

⁸⁵ TEA: Trietilamina

- los inhibidores de los canales formados por la familia de las conexinas como 1-octanol (1 mM), carbenoxolona (200 μ M), probenecid (1 mM), mefloquina (30 μ M) y quinina (200 μ M) no bloquearon a CALHM1, incluso a concentraciones tan elevadas como las usadas (Ma y col., 2012; Siebert y col., 2013; Tanis y col., 2013)
- los bloqueantes de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA MK-801 (100 μ M) y memantina (100 μ M) no modularon el canal (Ma y col., 2012; Tanis y col., 2013)
- el inhibidor de los canales TRP⁸⁶ SKF96365 (50 μ M) no produjo ningún efecto (Tanis y col., 2013)
- a nivel de la modulación de la homeostasia de Ca^{2+} del RE, la tapsigargina (100 nM), que bloquea irreversiblemente la SERCA, no moduló el canal (Tanis y col., 2013). El inhibidor más específico de los RIP₃s Xespostongina C (2 μ M) y el bloqueante de los RRI Dantroleno (10 μ M), por su parte, no produjeron ningún efecto (Dreses-Werringloer y col., 2008)
- con respecto a los moduladores de la homeostasia de Ca^{2+} de la mitocondria, se ha comprobado que el bloqueante del mUP rojo rutenio (20 μ M y, en el caso de *C. elegans*, 80 μ M) fue capaz de inhibir la señal de Ca^{2+} inducida por CALHM1 (Ma y col., 2012; Tanis y col., 2013).

Por tanto, el CALHM1 es bloqueado por concentraciones elevadas de bloqueantes de canales de Ca^{2+} inespecíficos, tales como el Co^{2+} , el Ni^{2+} y el Gd^{3+} y por el rojo rutenio, que es un inhibidor del mUP. Curiosamente, Co^{2+} , Ni^{2+} y Gd^{3+} también son capaces de bloquear el mUP (Unitt y col., 1999).

4.5.5 EL POLIMORFISMO P86L-CALHM1 Y SU IMPLICACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Desde el descubrimiento de CALHM1 como canal de Ca^{2+} , se tuvo conocimiento de que su polimorfismo P86L (rs2986017; obtenido por la sustitución de

⁸⁶ TRP: Acrónimo inglés de "Transient Receptor Potential"

una Prolina por una Leucina en el codón 86, P86L-CALHM1) (Dreses-Werringloer y col., 2008). Este polimorfismo se caracteriza por: *i*) presentar una menor permeabilidad al Ca^{2+} , conduciendo transientes de Ca^{2+} menores que el canal nativo; *ii*) inducir una mayor producción del βA , en especial de sus formas más agregantes y tóxicas, βA_{1-40} y βA_{1-42} ; y, *iii*) guardar alguna relación epidemiológica con el riesgo de padecer Alzheimer (Dreses-Werringloer y col., 2008).

Con respecto a la relación epidemiológica hay una gran controversia: De una parte, algunos autores demuestran que P86L-CALHM1 supone un riesgo de padecer Alzheimer (Dreses- Werringloer y col., 2008; Cui y col., 2010; Shibata y col., 2010; Boada y col., 2010; Aqdam y col., 2010; Lin y col., 2010), mientras que otros indican que no hay asociación alguna entre P86L-CALHM1 y la EA (Bertram y col., 2008; Minster y col., 2009; Sleegers y col., 2009; Beecham y col., 2009; Inoue y col., 2010; Nacmias y col., 2010; Tan y col., 2011; Fehér y col., 2011; Tao y col., 2014).

La disparidad de resultados obtenidos, en ocasiones debida a estudios estadísticos divergentes, hizo preciso la realización de un meta-análisis en el que se incluyeron 22.936 sujetos (siendo 7.873 enfermos y 13.274 controles), procedentes de Bélgica, España, Estados Unidos, Finlandia, Francia, Italia, Reino Unido y Suecia. La asociación de P86L-CALHM1 con el riesgo de padecer Alzheimer se determinó mediante una regresión logística múltiple, ajustada para la edad, el género, el genotipo de APOE y el centro o país. Por su parte, se estudió la relación entre la edad de aparición de la enfermedad y el polimorfismo mediante un modelo mixto ajustado por género. Como resultados principales de este meta-análisis se comprobó que: *i*) la frecuencia del polimorfismo P86L es del 20 al 31 % en la poblaciones caucásicas; *ii*) la asociación del polimorfismo P86L y Alzheimer es baja, aunque significativa; *iii*) los pacientes homocigotos para el polimorfismo desarrollan la enfermedad entre 5-10 años antes; y, *iv*) el adelanto de la edad de aparición es más patente en los pacientes portadores de algún alelo APOE $\epsilon 4$. Por tanto, P86L-CALHM1 queda establecido como un factor genético que modifica la edad de aparición de la enfermedad de Alzheimer (Lambert y col., 2010).

¿Pero es P86L-CALHM1 un buen biomarcador de la patología? El grupo del Dr. Philippe Marambaud, una vez más, ha señalado que se puede comportar como un predictor del inicio de la patología, pues han demostrado que los niveles de βA_{1-42} y βA_{1-40} en el LCR se hayan elevados en los sujetos portadores del polimorfismo,

cognitivamente sanos, pero con riesgo de padecer Alzheimer; sin embargo, en los pacientes ya diagnosticados de Alzheimer no se aprecian tales diferencias (Koppel y col., 2011). No obstante, otros autores sí han reportado niveles elevados de βA_{1-42} en el LCR de pacientes (Kauwe y col., 2010), aunque se aprecia una falta de consenso entre los distintos investigadores (Giedraitis y col., 2010).

Finalmente, el polimorfismo P86L-CALHM1 se ha visto relacionado con otras patologías neuronales, tales como la epilepsia del lóbulo temporal (Lv y col., 2011), o la enfermedad esporádica de Creutzfeldt-Jakob (Calero y col., 2012). Ello sugiere que P86L-CALHM1 confiere a las neuronas una cierta vulnerabilidad que favorece la evolución de diversas patologías nerviosas. Por otra parte, muy recientemente se han descrito otras variantes de CALHM1 en pacientes de Alzheimer de aparición temprana; así, las mutaciones de éstas que disminuyen la permeabilidad del canal (como la G330D) se correlacionan con una mayor vulnerabilidad frente al βA_{1-42} (Rubio-Moscardó y col., 2013). Por tanto, las mutaciones del elusivo canal CALHM1 que promueven una señalización de Ca^{2+} distinta, con respecto a la forma nativa del canal, tienen consecuencias patogénicas.

~~~~~5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Tal y como se ha descrito en la introducción, en la etiopatogenia de la EA se advierten una acumulación del βA , una hiperfosforilación de tau, y una dishomeostasia del Ca^{2+} . Recientemente, se ha descrito un nuevo factor de carácter genético que, por un mecanismo desconocido hasta el momento, podría acelerar la aparición de la patología: se trata de la homocigosis del polimorfismo P86L-CALHM1. De ahí que nuestra hipótesis de trabajo sea la siguiente:

P86L-CALHM1 altera diversas vías de señalización intracelular, lo que incrementa la vulnerabilidad celular frente a estímulos tóxicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer

Intentaremos responder esta hipótesis planteándonos los objetivos descritos a continuación.

6. OBJETIVOS

6. OBJETIVOS

Con el fin de estudiar las características fisiológicas de CALHM1 y patológicas de su polimorfismo P86L-CALHM1, nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

- 1) Estudiar pormenorizadamente la señalización intracelular de Ca^{2+} mediada tanto por CALHM1 como por P86L-CALHM1. Analizaremos dichas señales de Ca^{2+} en citosol, mitocondria, retículo endoplásmico y núcleo.
- 2) Buscar moduladores farmacológicos tanto de CALHM1 como de P86L-CALHM1. Por una parte, nos interesamos en hallar un bloqueante de CALHM1 como herramienta farmacológica que nos permita estudiar a dicho canal *per se*; por otra parte, pretendemos encontrar un modulador de P86L-CALHM1 que mitigue el efecto de la mutación.
- 3) Analizar el efecto de P86L-CALHM1 en la vulnerabilidad celular frente a diversos estímulos tóxicos. Investigaremos las vías de señalización intracelular responsables de dicha vulnerabilidad.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se describen los protocolos y materiales empleados a lo largo de este Trabajo de Investigación.

7.1. Líneas celulares

Para la consecución de los objetivos de la presente Memoria, se utilizaron tres líneas celulares, a saber, HeLa, HT22 y SH-SY5Y.

7.1.1 Línea celular de carcinoma de endometrio humano HeLa

Las células HeLa son células adherentes, grandes, poligonales, de origen epitelial, provenientes de un carcinoma de endometrio (Fig. 16). Se trata de la primera línea celular humana inmortalizada, hito logrado en 1951, cuando fueron extraídas de la Sra. Henrietta Lacks sin su consentimiento y procesadas en el laboratorio del matrimonio Gey, del hospital Johns Hopkins (Baltimore, Maryland, EE.UU.) (historia maravillosamente relatada por Rebecca Skloot en “La vida inmortal de Henrietta Lacks” (Skloot, 2012)).

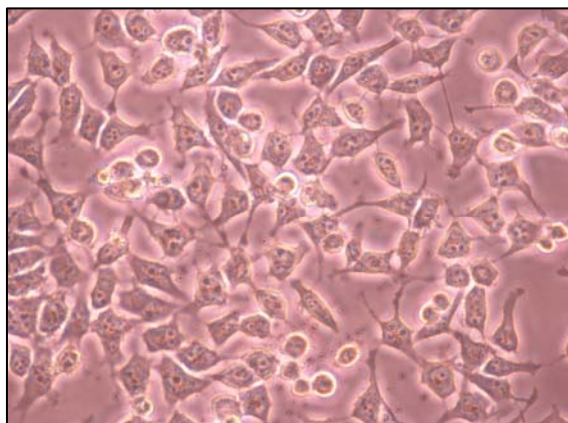


Fig. 16.- **Células HeLa.**

Imagen de células HeLa obtenida en un microscopio óptico (x400). Laboratorio ITH9.

La línea HeLa es un modelo celular sencillo y excepcionalmente útil para el estudio de señales de Ca^{2+} , pues estas células carecen de mecanismos implicados en la amplificación de dicha señal que pueden dificultar su interpretación, tales como CCDV y RRI funcionales (Bennett y col., 1996) o el mpNCX (Low y col., 1993).

Estas células fueron obtenidas gentilmente de la mano de Dña. Paqui Molina (Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital Universitario de la Princesa), quien las mantenía libre de infecciones de *Mycoplasma* (véase más adelante).

7.1.2 Línea celular de neuronas de hipocampo de ratón HT22

Las HT22 son células adherentes, pequeñas y con cierta tendencia a emitir prolongaciones (Fig. 17). Se trata de una línea celular inmortalizada derivada de HT4, un cultivo primario de neuronas de hipocampo de ratón (Davis y Maher, 1994).

Las células HT22 expresan los marcadores colinérgicos típicos, como el transportador de alta afinidad a la colina, la colina acetil-transferasa, el transportador vesicular de ACh y receptores muscarínicos de ACh (Liu y col., 2009). Además, poseen receptores de glutamato de tipo NMDA (Morimoto y Koshland, 1990a y b). Dado que se trata de un cultivo de neuronas hipocampales con características colinérgicas, se han establecido como un modelo *in vitro* útil para estudiar la etiopatogenia de la EA (Behl y col., 1995; Dreses-Werringloer y col., 2013; Martínez y col., 2013).

La línea celular HT22 se ha venido utilizando en diversos modelos de muerte mediada por distintos estímulos tóxicos, tales como excitotoxicidad (Ha y Park, 2006), hipoxia (Khanna y col., 2006; Ouh y col. 2013), estrés oxidativo (Behl y col., 1995; Chen y col., 2005) o βA (Behl y col., 1995; Cumming y Schubert, 2005; Marín y col., 2007; Lulevich y col., 2010; Cha y col., 2012; Martínez y col., 2013), entre otros. Igualmente, se han mostrado especialmente valiosas para estudios de neuroprotección frente a mencionadas condiciones de toxicidad, como hipoxia (Du y col., 2014), estrés oxidativo (Sato y col., 2000; Gursoy y col., 2002; Yang y col., 2014) o βA (Brimson y col., 2012; Kim y col., 2005), en la cual la participación de los receptores de estrógenos es fundamental (Deecher y col., 2005).

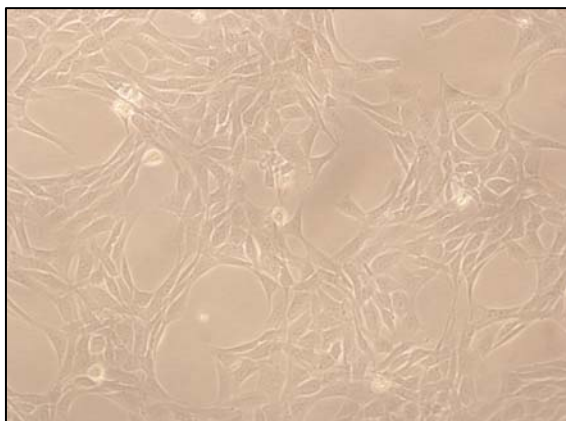


Fig. 17.- Células HT22.

Imagen de células HT22⁷⁵ obtenida en un microscopio óptico (x200). Laboratorio ITH9.

7.1.3 Línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y

Las células SH-SY5Y son adherentes, medianas, con tendencia a agregarse y a emitir prolongaciones (Fig. 18). Proviene n de un neuroblastoma humano metastásico de una niña de 4 años; para su inmortalización, se necesitó realizar distintos subclones con el fin de conseguir un claro fenotipo neuronal (Biedler y col., 1973; Biedler y col., 1978).

La línea celular SH-SY5Y es un modelo neuronal ampliamente utilizado. Estas células presentan actividad dopamina β -hidroxilasa (Oyarce y col., 1991), canales de Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} dependientes de voltaje (Morton y col., 1992; Reeve y col., 1992; Reuveny y Narahashi, 1993; Brown y col., 1994), receptores de ACh nicotínicos (Gould y col., 1992) y muscarínicos (Mei y col., 1989), receptores de dopamina post-sinápticos D_2L (Nair y col., 1996), receptores de glutamato tipo NMDA (Nair y col., 1996), receptores purinérgicos P2X_7 (Larsson y col., 2002) y receptores de opioides (Kazmi y Mishra, 1986) y son capaces de responder eléctricamente mediante potenciales de acción (Kuramoto, 1981; Johansson, 1994). Debido a su carácter neuronal, al ser cultivadas en determinadas condiciones (por ejemplo, en presencia de NGF o de ácido retinoico), se diferencian hacia neuronas, es decir, cambian su fenotipo hacia otro más típicamente neuronal, con una prolongación principal axónica y otras neuritas más pequeñas, de carácter dendrítico, y disparan potenciales de acción de manera más eficaz (Johansson, 1994). No obstante, a lo largo del trabajo experimental, las hemos mantenido en un

estado indiferenciado, en el cual solo ciertas de estas propiedades neuronales pueden ser parcialmente afuncionales (por ejemplo, la actividad de los receptores de glutamato (Preis y col., 1988; Jensen y col., 1992; Jantas y col., 2014)).

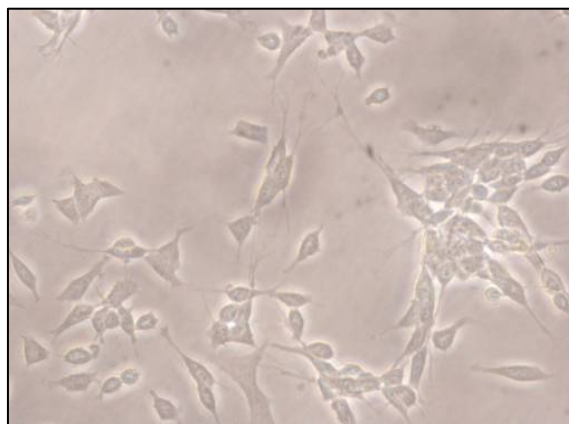


Fig. 18.- **Células SH-SY5Y.**

Imagen de células SH-SY5Y⁶⁷ obtenida en un microscopio óptico (x200). Laboratorio ITH9.

En el presente Trabajo de Investigación, se han utilizado tres líneas celulares, a saber, carcinoma de endometrio humano (HeLa), neuroblastoma humano (SH-SY5Y) y neuronas de hipocampo de ratón (HT22).

Para comenzar a estudiar CALHM1/P86L-CALHM1 como canales de Ca^{2+} , se decidió utilizar un modelo celular sencillo y fácilmente transfectable, que además careciera de mecanismos de amplificación de la señal intracelular del Ca^{2+} , tales como los CCDV, el mpNCX o los RRI: las células HeLa (Fig. 16) se convirtieron en el modelo celular fetén.

Pero, dado que CALHM1 es un canal neuronal, fue precisa la utilización de otros modelos celulares neuronales, tales como la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Fig. 17) o la línea de hipocampo de ratón HT22 (Fig.18).

Pese a haber utilizado en este trabajo de investigación tres líneas celulares distintas, obteniendo en ellas resultados similares, es preciso hacer notar la limitación del uso de estos modelos y, de ahí, la interpretación de los resultados. Como nota curiosa, por ejemplo, pese a las grandes ventajas que ofrece la línea celular HeLa, es de saber que a lo largo de sus más de 60 años de historia han sufrido tal cantidad de mutaciones y transposiciones cromosómicas que en la actualidad poseen de 70 a 90 cromosomas (nada comparado con el cariotipo humano de 46 cromosomas) (Heng, 2013; Callaway, 2013; Adey y col., 2013). Igua les consideraciones deberían hacerse al estudiar un animal al que se le

deleciona un gen (popularmente conocido por su denominación inglesa "KO"⁸⁷, Knock-Out" (Travis, 1992)), o un ratón transgénico al que se le añade en su genotipo al azar un gen (transgén) humano (Gordon y Ruddle, 1983) o incluso unas células humanas maduras reprogramadas (las recientemente descubiertas iPSc⁸⁸), cuyo nuevo fenotipo dista sobremanera del suyo original (Yu y col., 2007).

Por tanto, hay que considerar que los modelos científicos empleados son precisamente eso, modelos que simplifican un estado natural y que nos ayudan a entender pequeños fragmentos de los procesos biológicos, cuya complejidad nos es del todo inabarcable.

7.2. Mantenimiento de los cultivos celulares

Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37 °C, con una atmósfera de aire (95%) y CO₂ (5%) saturada de humedad.

Los tres tipos celulares se mantuvieron en cultivo en monocapa en botellas de 75 cm² (Corning, Corning, EE.UU., para HeLa y HT22 o Becton Dickinson, Madrid, España, para SH-SY5Y).

El medio de cultivo utilizado, tanto para las células HeLa, como para las HT22 fue DMEM⁸⁹ con una alta concentración en glucosa (4500mg/l), suplementado con un 10% de suero bovino fetal inmunológicamente inactivado por calor (en adelante, SBF⁹⁰), 2 mM de L-glutamina y 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin; por su parte, el medio de cultivo empleado para las células SH-SY5Y fue una mezcla DMEM/Mezcla de Nutrientes de Ham-F12 (en una proporción 1:1), suplementada de igual manera que el anterior medio (siendo todos los productos de Lonza, Basilea, Suiza).

El medio de cultivo se cambió por medio fresco cada 2-3 días. Cuando el cultivo alcanzaba el 80% de confluencia, se levantaban las células de la botella, lavándolas

⁸⁷ KO: Knock out, ratón delecionado para un gen

⁸⁸ iPSc: Acrónimo inglés "induced pluripotent stem-cell", que define a las células troncales pluripotentes reprogramadas

⁸⁹ DMEM: Del inglés ("Dulbecco's modified Eagle medium"), medio de Eagle modificado por Dulbecco

⁹⁰ SBF: suero bovino fetal inmunológicamente inactivado por calor

previamente con solución tampón fosfato (PBS⁹¹), utilizando Tripsina-EDTA⁹² (de Lonza, Basilea, Suiza), para romper las adhesiones celulares entre ellas y con la pared de plástico de las botellas. Tras una centrifugación suave, se resuspendía el sedimento con medio de cultivo fresco y se diluía con el fin de reducir el número total de células, controlando, de esta manera, el crecimiento en monocapa de los cultivos.

Para su almacenamiento, las células se lavaban, levantaban y centrifugaban, como se ha descrito anteriormente, aunque el sedimento se resuspendió en un volumen pequeño de solución de congelación y se depositaron en criotubos. Dicha solución de congelación contiene un 75% de SBF y un 25% de medio de cultivo completo, para las células HeLa, mientras que para las células SH-SY5Y y las HT22 contiene un 10% de DMSO⁹³ (Panreac, Barcelona, España), un 20% de SBF y un 70% de medio de cultivo completo. Las células se congelaron de manera lenta, por medio de una solución de alcoholes (etanol/isopropanol, en una relación 1:1), que disminuye la temperatura a un ritmo de 1° por hora en un congelador de -80° C y, pasados 3 días, se guardaron en N₂ líquido (-173° C).

Para poder desarrollar una investigación fidedigna, es preciso que las células empleadas se encuentren en unas condiciones de salubridad óptimas; ello permitirá que el comportamiento celular sea homogéneo para cada tipo celular. Una de las dificultades técnicas más frecuentes en el mantenimiento de los cultivos celulares es la contaminación con *Mycoplasma*, la cual es, a priori, difícilmente detectable, (se puede recabar más información en <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/cell-culture-products/mycoplasma-detection-and-removal/background-on-mycoplasma-contamination.aspx>). No obstante, la presencia de corpúsculos intracelulares aberrantes, disrupciones en la refringencia celular debido a alteraciones en la membrana plasmática, variaciones en la tasa de crecimiento de la línea celular, incrementos en la vulnerabilidad a estímulos tóxicos o dificultades en conseguir transfecciones con una eficiencia razonable hacen presagiar la contaminación; de hecho, las bacterias alteran la expresión de cientos de genes y compiten con las células por los nutrientes (Callaway, 2014). Por ello, su control

⁹¹ PBS: Solución tampón fosfato

⁹² EDTA: Ácido etiléndiaminotetraacético

⁹³ DMSO: Dimetilsulfóxido

periódico mediante PCR⁹⁴) o tinciones de núcleos con DAPI⁹⁵ (de Sigma Aldrich, Madrid, España) es crucial. En los casos en los que *Mycoplasma* fue detectado (Fig. 19), el cultivo celular fue sometido a un tratamiento con Plasmocin (InvivoGen, Barcelona, España) 25 µg/mL durante 15 días, seguido de otros 15 días de lavado del antibiótico, antes de poder utilizar el cultivo convenientemente.

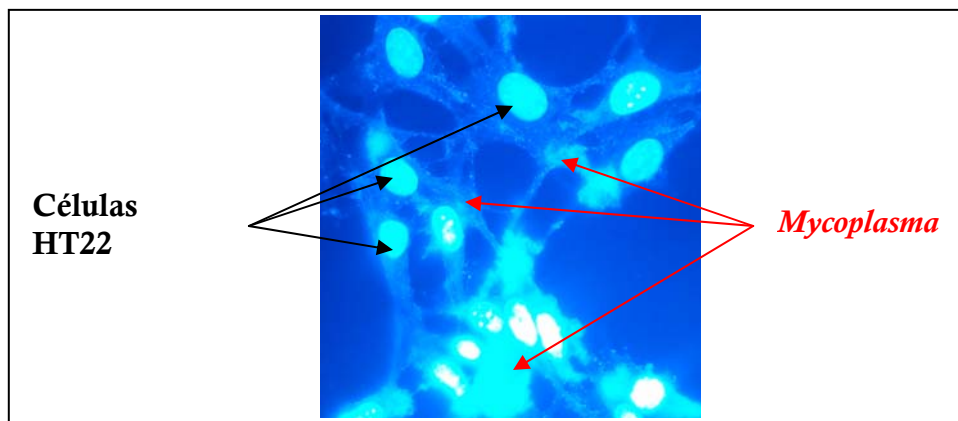


Fig. 18.- Cultivo contaminado con *Mycoplasma*.

Imagen de células HT22 contaminadas con *Mycoplasma* -tinción punteada- teñidas con dihidrocloruro de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), obtenida en un microscopio óptico de epifluorescencia (x630). Laboratorio ITH9

7.3 Medidas de Ca^{2+} a nivel subcelular mediante la proteína bioluminiscente ecuatorina

En este trabajo experimental, se han realizado medidas de concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) en distintas organelas, a saber citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$), mitocondria ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ ⁹⁶) y núcleo ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ ⁹⁷). Para ello, se han empleado unas proteínas bioluminiscentes sensibles a Ca^{2+} llamadas ecuatorinas (AEQs⁹⁸), dirigidas genéticamente a dichos componentes subcelulares.

⁹⁴ PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, del acrónimo inglés "Polymerase Chain Reaction"

⁹⁵ DAPI: Dihidrocloruro de 4',6-diamidino-2-fenilindol

⁹⁶ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$: Concentración de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial

⁹⁷ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$: Concentración de Ca^{2+} en el nucleoplasma

⁹⁸ AEQ: Ecuorina

7.3.1. Fundamento de la técnica

Inicialmente extraída de la medusa *Aequorea victoria* (Murbach y Searer, 1902) (Fig. 19a) con el fin de medir $[Ca^{2+}]$ concentraciones de Sr^{2+} ($[Sr^{2+}]^{99}$) (Shimomura y col., 1962; Shimomura y col., 1963), la clonación del ADN copia (ADNc¹⁰⁰) de la apoproteína de la AEQ⁹⁸ (apoAEQ¹⁰¹) en 1985 por el grupo de Inouye, incrementó su popularidad, no solo al permitir su uso en todos los tipos celulares transfectables e infectables, sino que además introdujo la posibilidad de dirigir la AEQ a compartimentos subcelulares, al poderse añadir a la secuencia de la apo-AEQ determinadas secuencias de direccionamiento (Tabla 3) (Inouye y col., 1985; Brini y col., 1999; Pozzan y Rizzuto, 2008; Bonora y col., 2013).

Pese al desarrollo de gran diversidad de métodos para medir Ca^{2+} como el $^{45}Ca^{2+}$ (Oldershaw y col., 1991; Missiaen y col., 1992), el Ca^{2+} conjugado (Morad y col., 1988) o multitud de sondas sensibles a Ca^{2+} , fluorescentes y más fáciles de detectar, como Fura-2 (Grynkiewicz y col., 1985), Indo-1 (Minta y col., 1989), Fluo-4 (Tsien, 1980), pericams (Nagai y col., 2001), camaleones (Truong y col., 2007) y sus variantes amarillas (Nagai y col., 2004), camgaroos (Griesbeck y col., 2001), etc., la utilización de AEQs sigue siendo muy utilizada en numerosos laboratorios, debido a su gran versatilidad, reproducibilidad y a la facilidad de interpretación de los resultados obtenidos.

La AEQ es una proteína formada por la apoAEQ y un grupo prostético, el luminóforo celenterazina. La apoAEQ está compuesta de 189 aminoácidos, que conforman una proteína de aproximadamente 22 kDa. De su secuencia de nucleótidos, se puede deducir que la apoAEQ presenta 4 dominios E-F, presentando 3 de los cuales una alta afinidad por el Ca^{2+} (Inouye y col., 1985). Estos dominios E-F le confieren a la proteína una estructura globular, que forma una cavidad hidrofóbica en la cual se inserta la celenterazina, de manera que cuando ésta se halla unida a la proteína, dicha cavidad permanece cerrada (Fig. 19d).

⁹⁹ $[Sr^{2+}]$: Concentración de Sr^{2+}

¹⁰⁰ ADNc: ADN copia

¹⁰¹ Apo-AEQ: Apoecurina

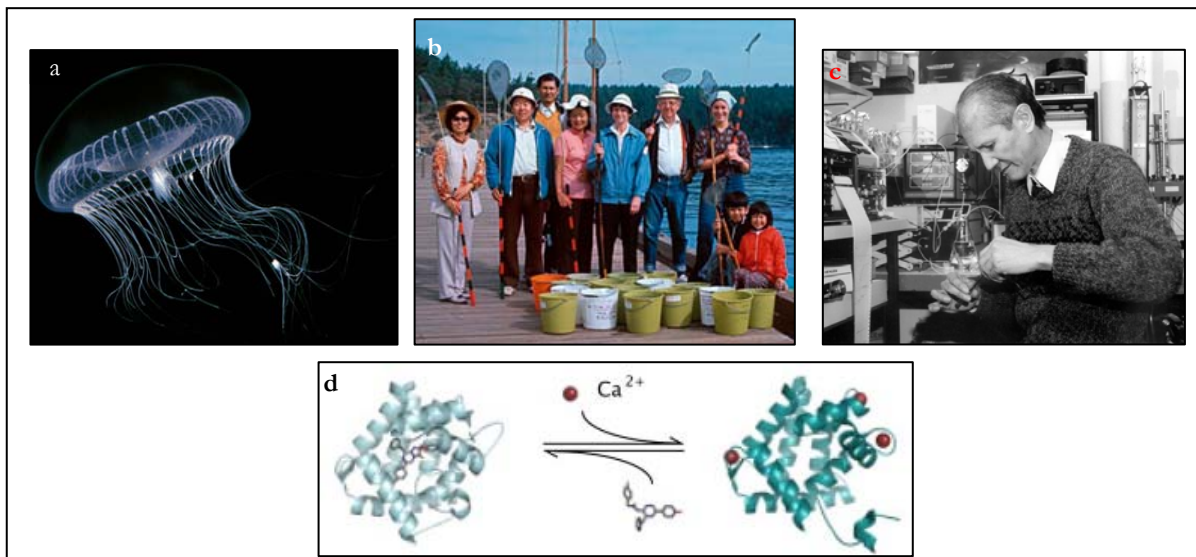


Fig. 19.- Descubrimiento de la ecuorina (AEQ).

a) Medusa *Aequorea victoria* (Murbach y Searer, 1902). b) Familia Shimomura pescando medusas.

c) Osamu Shimomura extrayendo AEQ. d) Estructura molecular y reacción química de la AEQ.

Fuentes: a) y b) : http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/illpres.

html?print=1; c: <http://www.bu.edu/today/2008/bu-prof-wins-nobel-prize-in-chemistry/>; d:

<http://www.openoptogenetics.org/index.php?title=File:Aequorin.png>

Localización subcelular	Acrónimo	Secuencia de direccionamiento añadida	[Ca ²⁺] máxima detectada (mutaciones)
Citosol	AEQ-cit	Ninguna	10-15 μM
Núcleo	AEQ-nuc	Fragmento del receptor de glucocorticoides de rata	10-15 μM
Matriz mitocondrial	AEQ-mit	Subunidad VIII de la citocromo C oxidasa (COX VIII)	10-15 μM
	AEQ-mitmut	COX VIII	500 μM (Asp119Ala del 2º dominio E-F)
	AEQ-mitmut28,119	COX VIII	1000 μM (Asn28Leu y Asp119Ala)
Espacio intermembrana de la mitocondria	AEQ-imm	Glicerol fosfato deshidrogenasa (proteína integral de la membrana mitocondrial interna)	10-15 μM
Membrana plasmática	AEQ-mp	SNAP25 (unida a superficie interna de la membrana plasmática)	10-15 μM
Retículo endoplásmico	AEQ-REmut	Dominio CH1 de la cadena pesada de una inmunoglobulina (que interacciona con GRP78)	500 μM (Asp119Ala)
Retículo sarcoplásmico	AEQ-SRmut	Calsecuestrina	500 μM (Asp119Ala)
Aparato de Golgi	AEQ-gomut	Sialotransferasa	500 μM (Asp119Ala)
Vesículas secretoras	AEQ-vampmut	Sinaptobrevina	500 μM (Asp119Ala)
Peroxisomas	AEQperox	Péptido señal peroxisomal	500 μM (Asp119Ala)

Tabla 3.- Resumen de las distintas ecuorinas (AEQs) sintetizadas hasta el momento.

Fuente: Modificado de Bonora y col., 2013.

La unión de 3 cationes de Ca^{2+} a la AEQ genera un cambio conformacional que rompe el enlace covalente entre la apoAEQ y la celenterazina, quedando la molécula de apoAEQ abierta, oxidándose la celenterazina a celenteramida y emitiéndose 1 fotón a 468 nm (luz azul) (Figs. 19d y 20). Esta reacción es irreversible y consume las moléculas de AEQ (Granatiero y col., 2013). Así, cuanto más $[\text{Ca}^{2+}]$ haya en una muestra, más moléculas de celenterazina se oxidarán, generándose así una mayor señal de luminiscencia.

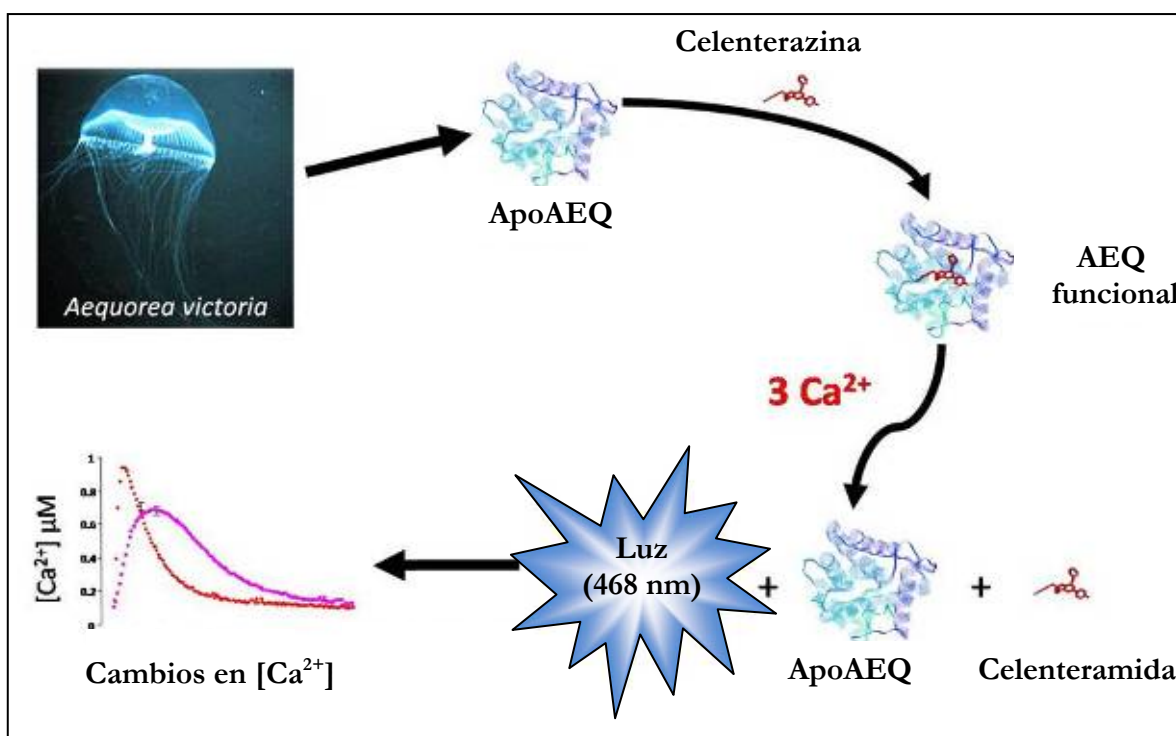


Fig. 20.- Reacción bioluminiscente de las ecurinas (AEQ).

La unión de 3 cationes de Ca^{2+} a la AEQ genera un cambio conformacional de la AEQ genera la liberación de la celentarazina, la cual se oxida a celenteramida, emitiéndose en el proceso un fotón a una $\lambda = 468 \text{ nm}$ (azul).

Fuente: Modificado de <http://www.openoptogenetics.org/index.php?title=File:Aequorin.png>

Para poder transformar los valores de luminiscencia obtenidos en $[Ca^{2+}]$, hemos de realizar un calibrado de la AEQ, descrito por el grupo de Tullio Pozzan (Brini y col., 1995). Las curvas de calibración relacionan la luminiscencia obtenida para cada punto del experimento con la $[Ca^{2+}]$, mediante el siguiente algoritmo matemático:

$$[Ca^{2+}](M) = \frac{Cociente + (Cociente \times K_{TR} - 1)}{K_R - (Cociente \times K_R)}$$

Siendo $K_{TR} = [T]/[R]$, donde T y R son los dos posibles estados en los que se pueden encontrar los sitios de unión al Ca^{2+} y la luz se emite cuando todos los sitios están en el estado R ; y K_R es la constante de asociación del Ca^{2+} .

Y donde el *cociente* es:

$$\text{Cociente} = \left(\frac{L}{L_{\max} \times \lambda} \right)^{\frac{1}{n}}$$

Siendo L la luminiscencia media de cada punto menos la luminiscencia basal; L_{\max} , la integral de la luminiscencia total menos la basal desde ese punto hasta el final del experimento (dado que la AEQ se va consumiendo -“quemando”- progresivamente a lo largo del experimento, el valor de L_{\max} va disminuyendo); n , el número de sitios de unión a Ca^{2+} de la AEQ y λ , la constante de consumo de la AEQ a concentración saturante de Ca^{2+} . Dos parámetros importantes en la calibración son el mínimo de luminiscencia que se va advirtiendo a lo largo del experimento y, por otra parte, el máximo de luminiscencia, el cual se determina al finalizar cada experimento perfundiendo a las células con una solución de lisis celular, que contiene 100 μM de digitonina y a la que se añade una concentración saturante de 10 mM de Ca^{2+} , a fin de “quemar” la AEQ⁸ remanente.

La calibración se puede hacer fácilmente *in situ* con la ayuda de un programa informático, el cual va archivando los datos de luminiscencia cada 50 ms y para cada punto a lo largo del experimento, hace la media de cada valor de luminiscencia obtenido, sustrae la luminiscencia basal y calcula la fracción L/L_{\max} . Mediante el mismo programa, se sustituyen el resto de parámetros, obteniéndose la $[\text{Ca}^{2+}]$.

Para la realización de este estudio, hemos utilizado 4 tipos de AEQ⁹⁸, dirigidas genéticamente a distintos compartimentos subcelulares, a saber:

- **la AEQ citosólica (AEQ-cit, Fig. 21a)** (Brini y col., 1995): se trata de la AEQ silvestre, sin modificar genéticamente, pues su localización de manera natural es exclusivamente citosólica. Se le ha añadido la secuencia de la hemaglutinina, como epítipo. Puede monitorizar $[\text{Ca}^{2+}]$ hasta 10-15 μM
- **la AEQ mitocondrial (AEQ-mit, Fig. 21b)** (Rizzuto y col., 1992): es también silvestre y monitoriza $[\text{Ca}^{2+}]$ en el mismo rango. Contiene una

Braunschweig, Alemania), dispuestos en placas de 24 pocillos Corning, (Corning, EE.UU.), a una densidad de 8×10^5 células/pocillo.

A las 24 h de la siembra, se cotransfectaron las células con el ADNc de la apoAEQ correspondiente y el ADNc del vector vacío pcDNA3.1 (Control), del canal nativo CALHM1 (CALHM1) o de la forma mutada P86L de dicho canal (P86L-CALHM1). El ADNc codificante para CALHM1 y para P86L-CALHM1 fueron cedidos gentilmente por el Prof. Philippe Marambaud (The Albert Einstein College of Medicine, Bronx, 10461, Nueva York, EE.UU. y Litwin-Zucker Research Centre for the Study of AD, The Einstein Institute for Medical Research, North Shore-LIJ, Manhasset, Nueva York, EE.UU). Los experimentos se realizaron a las 40-50 h de la transfección.

Para realizar dicha cotransfección, se utilizaron como agentes de transfección Metafectene® (Biont, Martinsried/Planegg, Alemania), para las células HeLa o Lipofectamina 2000 (Life Technologies, Madrid, España), para las células SH-SY5Y, siguiendo las instrucciones de cada fabricante. En ambos casos, se trata de liposomas policationicos en los que se internalizan las moléculas de ADNc, cargadas negativamente; por ello, este método de transfección también se conoce como lipofección. Estos complejos liposoma-ADNc, al entrar en contacto con las células, son endocitados; las bombas de H^+ de los endosomas bombean H^+ , disminuyendo el pH de éstos, lo que provoca que se debilite la estructura de los liposomas. Finalmente, por desequilibrio osmótico, se rompen los endosomas de fase tardía, liberando al citosol su contenido, es decir, el ADNc libre. Al entrar la célula en división, los plásmidos entran en el núcleo, se transcriben y se traducen (Fig. 22; Zabner y col., 1995).

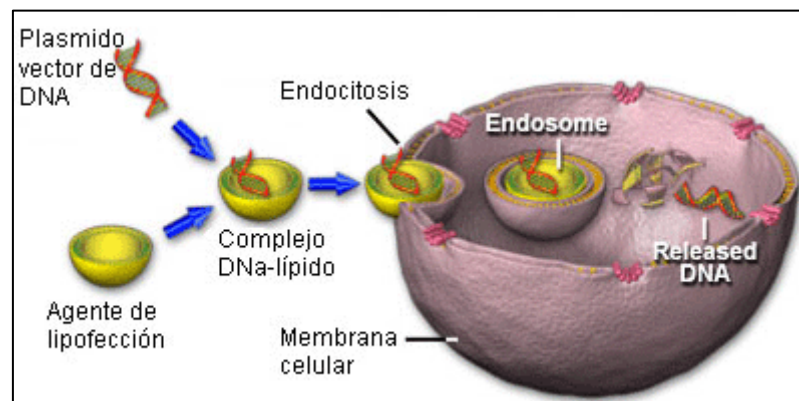


Fig. 22.- Esquema del proceso de transfección mediado por liposomas.

Los liposomas catiónicos engloban al ADNc y estos complejos ADNc-lípidos son endocitados. Dentro de las células, los endosomas se rompen, liberando el ADNc.

Fuente: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/203024/leccin_422_transfeccin.html

El grupo del Prof. Pozzan, demostró en 1994 que la cotransfección aumenta la eficacia de transfección; para la correcta expresión de los distintos plásmidos, la proporción de los mismos debe ser 1:1 (Brini y col., 1994b). En concreto, se transfectaron 0,75 µg del ADNc de la apoAEQ y 0,75 µg del ADNc del canal; así, tras la transfección, se expresarán en la misma célula tanto el canal, como la apoAEQ.

Nótese que solo se transfecta la apoAEQ con el fin de evitar el quemado prematuro de la sonda antes de la realización del experimento. No obstante, para que la AEQ sea funcional en el momento de las medidas, es preciso que su grupo prostético, la celenterazina, se halle unida a la apoAEQ (Figs. 19d y 20), lo cual se consigue en el proceso denominado "reconstitución". Dicha reconstitución consiste en la incubación de las células con 5 µM de celenterazina nativa (Biotium, Hayward, EE.UU.), durante 1-2 h previas al experimento a 37° C, en una solución de Krebs-HEPES para células no excitables, en el caso de las células HeLa que contiene, en mM: 125 NaCl, 5 KCl, 1 Na₃PO₄, 1 MgSO₄, 1 CaCl₂, 5,5 D-glucosa y 20 HEPES¹⁰⁴; o en una solución de Krebs-HEPES para células excitables, en el caso de las células SH-SY5Y, que contiene, en mM: 145 NaCl, 5,9 KCl, 1,2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 D-glucosa y 10 HEPES (procediendo todos los productos de Sigma Aldrich, Madrid, España), que se encuentran a pH=7,4 y se suplementan con un 1 % de SBF.

Para la realización del experimento, el cubreobjetos con las células preparadas se coloca en una cámara de perfusión construida al efecto, situada en íntimo contacto con un fotomultiplicador. Éste, a través de un discriminador de señal, transfiere los datos de luminiscencia a un sistema informático, que, a su vez, genera un archivo con los mismos. Este equipo ha de situarse en una cámara oscura para evitar interferencias debidas a ruido externo y para recoger toda la señal bioluminiscente emitida por la AEQ, la cual es muy débil (Fig. 23).

A lo largo del experimento, se precisará perfundir a las células con distintas soluciones, partiendo siempre de una solución Krebs-HEPES. En este trabajo,

¹⁰⁴ HEPES: N-[2-hidroxietil]-piperacino-N'-[2-ácido etanosulfónico]



Fig. 23.- Estructura básica del equipo necesario para la cuantificación de luz emitida por las AEQs.

Consta de una fuente de alimentación (no mostrado); una cámara de perfusión para las células (1), conectada a un sistema de electroválvulas de 5 vías (2), con el que se perfundirán controladamente las distintas soluciones; un fotomultiplicador para amplificar la señal (3) y un equipo informático para almacenar y analizar *in situ* la información (4).

hemos llevado a cabo fundamentalmente experimentos de reintroducción de Ca^{2+} , siguiendo en protocolo protocolo descrito por el grupo de Philippe Marambaud (Dreses-Werringloer y col., 2008): en un principio, se perfundió con una solución cero Ca^{2+} (solución Krebs-HEPES sin Ca^{2+} , con 0,5 mM EGTA¹⁰⁵), que se intercambió por otra solución Krebs-HEPES que contenía 1 mM de Ca^{2+} , tal y como se indica en las correspondientes figuras. Finalizada la reintroducción de Ca^{2+} , se suele administrar un pulso de histamina 100 μM , para comprobar la viabilidad de las células al concluir el experimento.

Con el fin de descubrir moduladores de la señal de Ca^{2+} inducida por el canal, a las distintas soluciones Krebs-HEPES (sin y con Ca^{2+}), se les añaden los distintos fármacos a las concentraciones indicadas en las correspondientes figuras.

En otro tipo de experimentos, se pretendió estimular la salida de Ca^{2+} desde el RE, mediante el empleo de agonistas de receptores metabotrópicos, como son la Histamina (100 μM), para las células HeLa, o la Bradiquinina (100 nM), para las células SH-SY5Y (ambos, de Sigma Aldrich, Madrid, España).

Por último, hace falta “quemar” la AEQ restante para poder inferir la $[\text{Ca}^{2+}]$, de manera que todos los experimentos se finalizaron perfundiendo una solución de lisis celular con 100 μM de digitonina (Sigma Aldrich, Madrid, España) a la que se añade una concentración saturante de Ca^{2+} de 10 mM.

¹⁰⁵ EGTA: Ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético

7.3.3 Moduladores farmacológicos empleados

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es la búsqueda de moduladores farmacológicos para CALHM1 tanto nativo, como su polimorfismo P86L-CALHM1. Con tal fin, se han empleado los siguientes fármacos:

- 2-APB (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- FCCP¹⁰⁶ (Abcam, Cambridge, Reino Unido)
- CGP37157 (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Co²⁺ (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Dimebona (Biotrend, Colonia, Alemania)
- Fluconazol (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Fragmento tóxico 35-35 del péptido β -amiloide (βA_{25-35} ¹⁰⁷) (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- ITH 12233 (compuesto sintetizado en el laboratorio del Dr. Cristóbal de los Ríos del Instituto Teófilo Hernando de i+D del Medicamento (ITH) de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) (ITH-UAM), en colaboración con el Instituto de Química Médica (IQM) del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (IQM-CSIC)), el cuál será aludido como ITH33
- ITH 12575 (compuesto sintetizado en el laboratorio del Dr. Cristóbal de los Ríos (ITH-UAM))

7.4 Determinación de las variaciones de Ca²⁺ mitocondrial mediante el Pericam mitocondrial

En la actualidad, existen numerosas técnicas, basadas en la fluorescencia, que permiten visualizar "in vivo" las variaciones en la [Ca²⁺] en las distintas organelas. Hemos empleado, una de ellas, el Pericam mitocondrial, para detectar en célula única la [Ca²⁺]_{mit}.

¹⁰⁶ FCCP: Carbonil cianida-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona

¹⁰⁷ βA_{25-35} : Fragmento tóxico 35-35 del péptido β -amiloide

7.4.1 Fundamento de la técnica

El Pericam mitocondrial es una quimera de la GFP con tecnología de permutación circular, de manera que los dominios amino- y carboxi-terminales han sido intercambiados e interconectados. Esta nueva quimera (llamada cpGFP¹⁰⁸) se encuentra fusionada a una calmodulina y a un péptido de unión M13, que detecta la unión del Ca²⁺ a la calmodulina, provocando un cambio conformacional de la proteína. El conjunto de la proteína (cpGFP, calmodulina y M13) se denomina Pericam, es fluorescente, ratiométrica y sus propiedades espectrales cambian reversiblemente ante los cambios de [Ca²⁺] (Fig. 24a; Nagai y col., 2001). Además, se le pueden añadir secuencias de direccionamiento, como la COX VIII, de manera que es capaz de detectar el Ca²⁺ en la matriz mitocondrial (Fig. 24b).

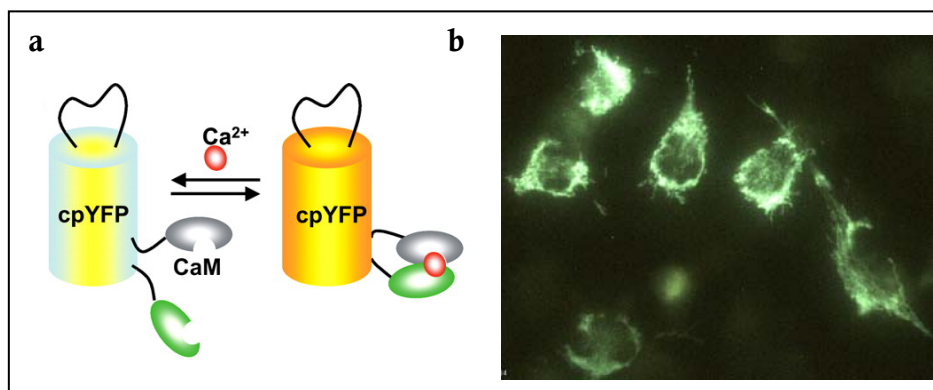


Fig. 24.- **Funcionamiento básico del Pericam.**

a) La quimera fluorescente permutada circularmente (cpYFP) está unida a un péptido de unión y a una calmodulina. Cuando el Ca²⁺ se une a la calmodulina, el péptido de unión provoca un cambio conformacional que cambia transitoriamente el espectro fluorescente del Pericam. *Fuente:* Rizzuto y Pozzan, 2006; b) Imagen de células HeLa transfectadas con el Pericam mitocondrial (x600) (ITH9)

7.4.2 Procedimiento experimental

Para estos experimentos, se utilizaron células HeLa, que fueron sembradas a una densidad de 5*10⁴ células/pocillo en cubreobjetos de vidrio redondos de 12 mm de diámetro (Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania), dispuestos en placas de 24 pocillos Corning, (Corning, EE.UU.).

¹⁰⁸ cpGFP: Proteína verde fluorescente con tecnología de permutación circular

Tras 24 h, se transfectaron con 1,25 µg del ADNc del Pericam mitocondrial. Una vez transcurridas 48 h de expresión, el cubreobjetos se colocó en una camarita dispuesta en un microscopio de epifluorescencia (BX51WI, Olympus, Japón), la cual se hallaba constantemente perfundida con solución Krebs-HEPES. Una vez estabilizada la fluorescencia, se trató a las células con 5 µM de oligómeros solubles de βA_{1-42} durante 5 min. Los cambios en el Ca^{2+} mitocondrial se monitorizaron tomando alternativamente imágenes de fluorescencia tras excitar a 410 y 490 nm y calcular la razón $UAF(490nm)/UAF(410nm)$.

7.5 Medida del pH de la matriz mitocondrial mediante la sonda fluorescente AlpHi

Para la determinación de las variaciones en el pH de la matriz mitocondrial, se empleó una sonda sintetizada por la Dra. María F. Cano Abad: mtAlpHi¹⁰⁹.

7.5.1 Fundamento de la técnica

mtAlpHi es una quimera de GFP con una gran sensibilidad a las variaciones de pH en el medio alcalino, como el que se presenta en la matriz mitocondrial. Se trata de un constructo derivado del "camgaroo2", en el que se ha substituido la calmodulina por una porción de ecuatorina que contiene dos dominios E-F y al que se le ha añadido una secuencia de direccionamiento a la mitocondria. Dicho "camgaroo2" es un mutante de una proteína fluorescente amarilla (YFP¹¹⁰) que presenta una gran sensibilidad a los cambios de pH por encima de 8; mientras que la fracción de ecuatorina insertada es insensible al Ca^{2+} . Esta nueva quimera, por tanto, cambia su espectro de fluorescencia únicamente ante variaciones de pH en un medio alcalino. Para evitar los artefactos típicos de los indicadores no ratiométricos, mtAlpHi se puede cotransfectar con otro derivado de GFP, en este

¹⁰⁹ mtAlpHi: Indicador del pH de la matriz mitocondrial (del inglés, "mitochondrial alkaline pH indicator")

¹¹⁰ YFP: proteína fluorescente amarilla

caso mtECFP¹¹¹, cuya fluorescencia no solapa con la de mtAlpHi y es insensible a las variaciones de pH (Abad y col., 2004).

7.5.2 Procedimiento experimental

Se sembraron células HeLa en cubreobjetos de vidrio redondos de 12 mm de diámetro (Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania), dispuestos en placas de 24 pocillos Corning, (Corning, EE.UU.) a una densidad de 5×10^4 células/pocillo. 24 h después de la siembra, se co-transfectaron con 0,75 µg del ADNc del mtAlpHi y 0,25 µg del ADNc de mtECFP.

Los experimentos se llevaron a cabo tras 48 h de expresión de las quimeras. El cubreobjetos, con las células ya preparadas, se colocó en una camarita constantemente perfundida con solución Krebs-HEPES, dispuesta en un microscopio de epifluorescencia (BX51WI, Olympus, Japón). Una vez estabilizada la fluorescencia, se trató a las células con 5 µM de oligómeros solubles de βA_{1-42} durante 5 min. Los cambios en el pH mitocondrial fueron monitorizados constantemente y se calculó la razón UAF(490nm)/UAF(410nm).

7.6 Visualización de la apertura del mPTP⁴³ con la técnica de Calceína- Co^{2+}

La apertura del mPTP ha sido detectada "in vivo", tanto directa, como indirectamente por distintas técnicas de imagen de fluorescencia. En este trabajo, hemos realizado la visualización a través de la técnica de la calceína- Co^{2+} .

7.6.1 Fundamento de la técnica

La calceína es una sonda fluorescente permeable en las células vivas; su fluorescencia se ve apagada en presencia de Co^{2+} . Esta sonda permea a través de todas las membranas, quedándose retenida a lo largo de toda la célula; sin

¹¹¹ mtECFP: Proteína fluorescente ciano dirigida a mitocondria

embargo, el Co^{2+} solo podrá internalizarse en aquellos compartimentos en los que haya una canal o co-transportador por el que pueda fluir. La membrana mitocondrial interna es impermeable al Co^{2+} , por lo que una vez las células han sido incubadas con calceína y con Co^{2+} , la única fluorescencia patente en la célula será la de las mitocondrias (en las que el contacto físico entre la calceína y el Co^{2+} se ha visto impedido; Fig. 55). Pero cuando el mPTP se abre, el Co^{2+} circundante puede entrar en la matriz mitocondrial, o la sonda fluorescente se puede diluir fuera de ella, lo que se aprecia con una caída inflexiva de la fluorescencia de la calceína (Petronilli y col., 1998).

7.6.2 Procedimiento experimental

Se sembraron células HeLa (5×10^4 células/pocillo) en cubreobjetos de vidrio redondos de 12 mm de diámetro (Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania), dispuestos en placas de 24 pocillos Corning, (Corning, EE.UU.).

24 h después de la siembra, las células se incubaron durante 30 min en una solución Krebs-HEPES que contenía 5 μM de calceína-AM (Invitrogen, Barcelona, España) y, posteriormente, se incubaron otros 15 min con otra solución sin la sonda, pero conteniendo 1 mM de Co^{2+} . Transcurrida la incubación, el cubreobjetos se colocó en una camarita perfundida constantemente con solución Krebs-HEPES, dispuesta en un microscopio de epifluorescencia (BX51WI, Olympus, Japón). Para observar la señal fluorescente de la calceína, hubo de excitarla a 592 nm. Una vez estabilizada la fluorescencia, se trató a las células con 25 μM de βA_{25-35} durante 20 min, en presencia o no de Dimebona 5 μM .

7.7 Cuantificación de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT

Para cumplir el tercer objetivo de esta Tesis Doctoral, hemos de determinar la influencia de CALHM1 o P86L-CALHM1 en la vulnerabilidad celular. Para comenzar este estudio, se realizaron ensayos de MTT¹¹².

¹¹² MTT: Sal de metiltetrazolio

(5mg/ml, disuelto en PBS) a 37° C durante 1 h; las sales de formazán formadas se disolvieron, por último, con DMSO.

La absorbancia fue leída a $\lambda=540$ nm mediante un lector de placas de Elisa (Berthold Detection Systems, Bad Wildbad, Alemania). La viabilidad celular se normalizó con respecto a su valor basal (sin tratamiento), siguiendo la ecuación:

$$Viabilidad = \left(\frac{A_{problema}}{A_{control}} \right) \times 100$$

Donde $A_{problema}$ es el valor de absorbancia obtenido en el pocillo con el tratamiento pertinente, mientras que $A_{control}$ es el valor medio de absorbancia obtenido de los pocillos control.

6.4.3 Estímulos tóxicos empleados

En este estudio, se ha analizado tanto la viabilidad celular en condiciones basales (células sin tratar), como células tratadas con distintos estímulos tóxicos:

- Ácido okadaico (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- βA_{25-35} (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Oligómeros solubles de βA_{1-42} humano (Sigma Aldrich, Madrid, España)

Los oligómeros de βA_{1-42} humano se han obtenido siguiendo el método descrito en 2010 por el grupo dirigido por el Prof. Luis Aguayo (Parodi y col., 2010). Así, el βA_{1-42} humano se disolvió con DMSO a una concentración de 2,3 mM y se guardó a -20° C; posteriormente, de manera extemporánea, se tomó una alícuota y se disolvió en PBS a una concentración final de 80 μ M, la cual se incubó 2 h en agitación vigorizada a 37° C. Por último, los oligómeros solubles de βA_{1-42} humano así formados se disolvieron con medio de cultivo, hasta obtener la concentración final deseada.

- Oligomicina y rotenona (ambos de Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Óxido de fenilarsina (PAO¹¹³, Sigma Aldrich, Madrid, España)

¹¹³ PAO: Óxido de fenilarsina

7.8 Estudio de la muerte celular por apoptosis

En este trabajo, hemos analizado la activación de la apoptosis a través de diversas técnicas, a saber, análisis de ciclo celular y de distintas fases de apoptosis mediante citometría de flujo y activación de caspasas.

7.8.1 Estudio del ciclo celular mediante tinción de cromatina con ioduro de propidio

7.8.1.1 Fundamento de la técnica

La cuantificación de ácidos nucleicos para el análisis del ciclo celular (Fig. 26) permite determinar el número de células en cada fase del ciclo celular. En condiciones normales, las células somáticas se encuentran en una fase estacionaria G0/G1 diploide ($2n$). La síntesis de ADN durante la fase S del ciclo conlleva a un incremento en el contenido de ADN, alcanzando una dotación $4n$ al final de la misma, que se mantiene durante las fases G2 y M, justo antes de la división celular (Lodish y col., 2002). Por su parte, durante la apoptosis se fragmenta el ADN, de manera que las células apoptóticas contienen una dotación de ADN hipodiploide.

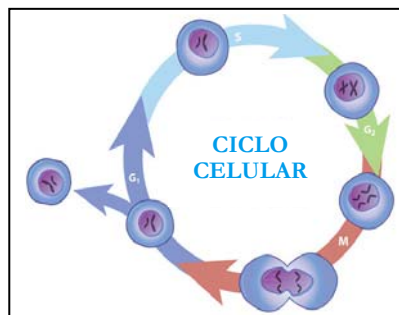


Fig. 26.- Esquema del ciclo celular.

Las células somáticas ($2n$) se encuentran en una fase estacionaria G0/G1. Tras la duplicación de ADN durante la fase S, la dotación de ADN se torna tetraploide. Después de la mitosis, cada célula hija contendrá, de nuevo, su típica dotación diploide.

Fuente: Modificado de <http://cajalesygalileos.wordpress.com/2012/11/29/los-eucariotas-y-el-ciclo-celular-scitable/>

Uno de los métodos más sencillos para cuantificar el ADN es tiñéndolo mediante un compuesto fluorescente intercalante en el ADN como es el ioduro e

propidio, IP¹¹⁴ (Sigma Aldrich, Madrid, España), el cual se intercala en los ácidos nucleicos de doble cadena, cuya fluorescencia emitida (a $\lambda=617$ nm) es por ende, proporcional al contenido de ADN. Mediante un citómetro de flujo, que detecta complejidad, tamaño y fluorescencia de las partículas que fluyen a través de su sistema de perfusión, se pueden seleccionar las células y determinar su contenido de ADN, en función de su cantidad de fluorescencia (Nicoletti y col., 1991).

7.8.1.2 Procedimiento experimental

Para cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos se sembraron las células en placas de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células HeLa/pocillo ó 5×10^5 células HT22/pocillo. Pasadas 24 h de la siembra, cuando se alcanzaba una confluencia del 50 %, se transfectaron con 1,25 μg de ADNc del vector vacío pcDNA3.1, de CALHM1 o de P86L-CALHM1 mediante lipofección, según el protocolo descrito anteriormente. 24 h después de la transfección, las células fueron sometidas a un tratamiento de 24 h de 5 μM de βA_{25-35} . Finalmente, las células se levantaron de los pocillos y se recogieron en PBS frío; se centrifugaron 5 min a 1500 rpm y se fijaron en etanol (70°) a 4° C durante 4-24 h. Pasado ese tiempo, se lavaron con PBS y se permeabilizaron (pues el IP no es permeable) y tiñeron con una solución de tinción que contenía IP (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ribonucleasa A (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y Triton X-100 (al 0,1 %) (siendo todos los productos de Sigma Aldrich, Madrid, España), todo ello disuelto en PBS, durante 30 min a temperatura ambiente; las células se conservaron en esta solución de tinción a 4° C, hasta su lectura en el citómetro de flujo.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo *Cytomics FC 500 MPL* surtido del programa informático para analizar los datos *MXP*, de Beckman Coulter (Madrid, España). El primer paso de este análisis fue seleccionar las partículas compatibles con nuestra población celular, en función de su tamaño y complejidad, eliminando dobletes, asociaciones celulares y detritos y restos de células (Fig. 27a). En cada partícula seleccionada, se cuantificó la intensidad de fluorescencia del IP por área, para estimar la cantidad de ADN, y se representaron en un diagrama de frecuencias, el cual se ajustaba a una distribución normal. En dicho diagrama, queda patente que la mayoría de la población celular tenía un contenido de ADN

¹¹⁴ IP: ioduro de propidio

diploide; la apoptosis, por su parte, se cuantificó como el porcentaje de partículas con un contenido hipodiploide, debido a la fragmentación del ADN típica de dicho tipo de muerte celular; mientras que las fases G2 y M también quedan representadas, correspondiéndose con los valores más altos de fluorescencia. El programa informático permite cuantificar tanto el porcentaje de células en cada etapa del ciclo celular, como la cantidad de células apoptóticas (Fig. 27b).

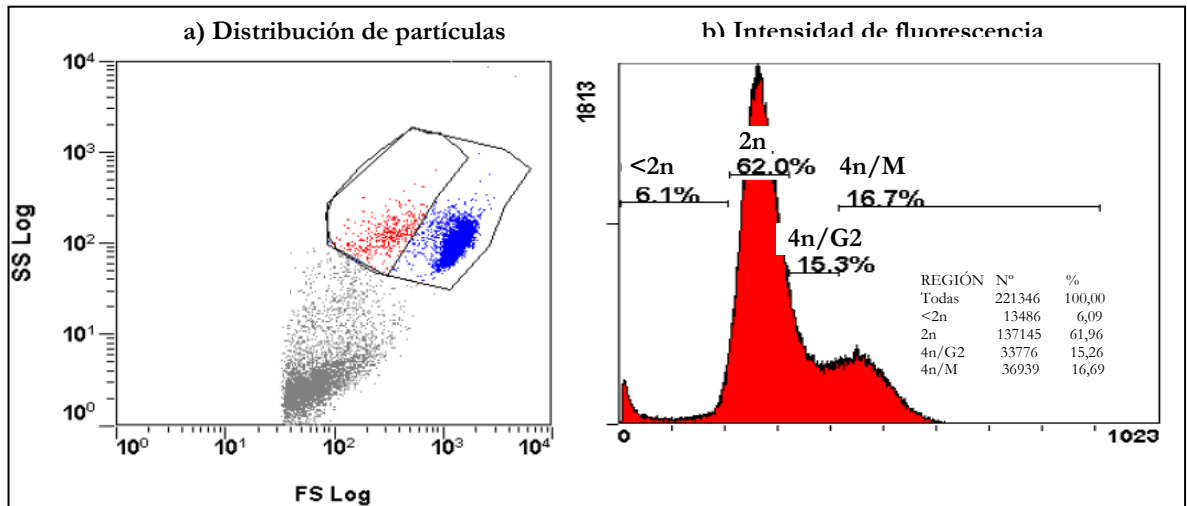


Fig. 27.- Representación típica del análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo, tras teñir la cromatina con yoduro de propidio (IP).

a) Análisis de las partículas en función de su complejidad (SS Log) y tamaño (FS Log).. La población azul corresponde a las células vivas; la roja, a las células muertas; la gris, a restos celulares y dobletes; **b)** Determinación de la intensidad de fluorescencia del IP contenido en las poblaciones celulares seleccionadas (en a, rojo y azul). El programa cuantifica tanto el número de células como el porcentaje de las mismas en las distintas fases del ciclo celular.

7.8.2 Estudio de las fases de la apoptosis mediante citometría de flujo

Para estudiar más detalladamente las fases de la apoptosis, utilizamos un kit comercial que contiene Anexina V fluorescente verde e IP (rojo), los cuales se pueden visualizar conjuntamente en un citómetro de flujo.

7.8.2.1 Fundamento de la técnica

Uno de los primeros procesos ocurrientes durante la apoptosis es la translocación de la fosfatidilserina de la monocapa interna a la monocapa externa de la membrana plasmática; ello constituye una señal de reconocimiento para el fagocito (Bratton y col., 1997; Fadok y col., 1998). La anexina V presenta una gran

afinidad por la fosfatidilserina, por lo que la unión de ambas proteínas es inmediata; en el kit comercial, la anexina V viene conjugada con un fluoróforo verde (en adelante, anexina V-FITC¹¹⁵).

Por otra parte, teñimos la cromatina con IP, pero sin permeabilizar la célula, de manera que éste, dada su impermeabilidad con la membrana plasmática, solo penetrará en aquellas células en las que la membrana plasmática se halle dañada.

Así las cosas, nos podemos encontrar con 4 situaciones distintas:

- i. células doblemente negativas: son células viables
- ii. células solamente positivas para la Anexina V: son células que han iniciado la apoptosis, es decir, que se encuentran en una apoptosis temprana
- iii. células doblemente positivas para la Anexina V y para el IP: son células que se encuentran en necroptosis o también llamada apoptosis tardía
- iv. células solo positivas para el IP: son células necróticas, con la membrana totalmente dañada.

7.8.2.2 Procedimiento experimental

Para analizar las distintas fases de la apoptosis, la siembra se realizó se en placas de 6 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células HeLa/pocillo ó 4×10^5 células HT22/pocillo. Una vez alcanzaron una confluencia del 50% (24 h), se transfectaron con 1,25 µg de ADNc de pcDNA3.1, CALHM1 o P86L-CALHM1, mediante lipofección, según los protocolos descritos anteriormente para cada tipo celular. Tras 24 h de la transfección, las células HeLa fueron sometidas a un tratamiento de 1 h de 5 µM de oligómeros de βA_{1-42} , mientras que las células HT22 fueron tratadas 12 h con βA_{25-35} .

A continuación, se añadieron la anexina V-FITC y el IP del kit comercial ANXVKF-100T, de Immunostep (Salamanca, España), siguiendo minuciosamente las instrucciones del fabricante. Así, las células se levantaron de los pocillos y se recogieron en PBS; se centrifugaron 8 min a 1000 rpm y se resuspendieron en un tampón de unión, en cuya composición destaca una alta $[Ca^{2+}]$ (25 mM), la cual es indispensable para la unión de la anexina V a la fosfatidilserina (Fadok y col, 1998). Posteriormente, las muestras se dispusieron en placas de 96 pocillos y se añadieron

¹¹⁵ Anexina V-FITC: Anexina V acoplada a un fluoróforo verde

7.8.3.1 Fundamento de la técnica

Para la determinación de las caspasas 3/7, se ha utilizado un kit comercial basado en un ensayo de luminiscencia, como el que se muestra en la Fig. 29 el cual consta de un sustrato luminogénico, luciferasa y un reactivo para lisar las células. El sustrato luminogénico contiene el residuo Z-DEVD-NH, el cual es reconocido por las caspasas 3/7; una vez escindido éste, el producto es una aminoluciferina, la cual reacciona con la luciferasa del kit, generándose una señal luminiscente, siendo ésta proporcional como a la cantidad de caspasas activas.

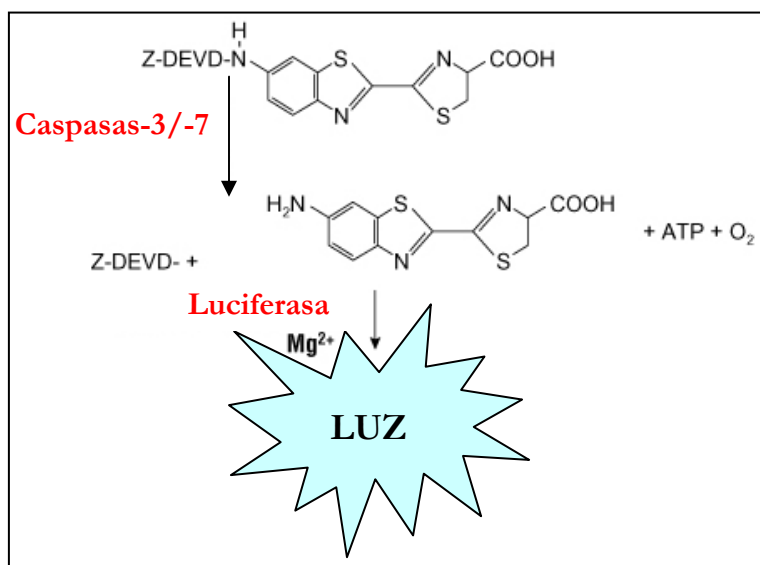


Fig. 29.- Reacción de luminiscencia para cuantificar la actividad de las caspasas-3/-7 mediante un kit comercial.

El compuesto suministrado por el kit lleva un sustrato que al ser reconocido por las caspasas 3/7 (el Z-DEVD-NH) es escindido por éstas, generándose como producto una aminoluciferina. Ésta, en presencia de la luciferasa del kit, provoca una reacción luminiscente, fácilmente detectable en un lector de placas.

Fuente: Modificado de http://www.promega.es/products/cell-health-and-metabolism/apoptosis-assays/luminescent-caspase-assays/caspase_glo-3_7-assay-systems/?activeTab=0

7.8.3.2 Procedimiento experimental

Se sembraron 5×10^4 células HeLa/pocillo en placas de 48 pocillos y 24 h después se transfectaron con 0,5 μ g de pcDNA3.1, CALHM1 o P86L-CALHM1. Tras 24-40 h de expresión, se realizó un tratamiento de oligómeros de βA_{1-42} durante 3, 8 y 24 h. Una vez finalizado el tratamiento, se incubó durante 5 min el compuesto que contenía el residuo Z-DEVD-NH, siguiendo indicaciones del fabricante. La actividad de las caspasas se midió con el kit "Caspase-Glo® 3/7

Assay", de Promega Biotech Ibérica S.L. (Madrid, España). Las lecturas de luminiscencia se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo negro en el lector de placas Multi Detection System Glomax (Promega Biotech Ibérica, S.L., Madrid, España).

Los resultados se normalizaron con respecto a los valores de actividad basales de las correspondientes células sin tratar.

7.9. Determinación de la expresión de proteínas mediante “western blot”

El "western-blot", también llamado "inmunoblot" es una técnica analítica, ampliamente utilizada para detectar y cuantificar proteínas específicas presentes en una muestra biológica.

7.9.1 Fundamento de la técnica

La técnica de western blot consiste en la separación de las proteínas de una muestra biológica en función de su movilidad electroforética. Posteriormente, mediante el empleo de anticuerpos específicos, estas proteínas serán detectadas. En la Fig. 30 se muestra un esquema del procedimiento.

7.9.2 Procedimiento experimental

5x10⁵ células HeLa, una vez transfectadas con 0,5 µg de pcDNA3.1, CALHM1 o P86L-CALHM1 y tratadas 24 h con 5 µM de oligómeros solubles de βA₁₋₄₂ humano, se lisaron con 100 µL de tampón de lisis frío, el cual contenía 1% Nonidet P-40, 10 % glicerol, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mg/ml leupeptina, 1 mM fenilmetilsulfonil fluorida, 20 mM NaF, 1 mM Na₄P₂O₇ and 1 mM Na₃PO₄, todo disuelto en PBS (siendo todos los productos de Sigma Aldrich, Madrid, España). El lisado celular se centrifugó y, una vez descartado el sedimento, se continuó con el proceso o se almacenó la muestra a -80°C. Posteriormente, se midió la cantidad de proteínas presente en cada muestra mediante el "BCA Protein Assay Kit Reagent", de Fisher Scientific (Madrid, España). Finalmente, 30 µg de

proteína por cada muestra, se sometieron a una electroforesis durante 2 h a un amperaje constante y se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore, Madrid, España) durante 2 h a 70 mA. Tras ello, las membranas se bloquearon 2 h con solución tampón Tween 20-Tris que contenía un 4 % de albúmina (Sigma Aldrich, Madrid, España) y se incubaron 2 h más con anti-p-ERK¹¹⁶ (de Cell Signalling, Madrid, España), anti-t-ERK¹¹⁷ (de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.), anti-p-CREB¹¹⁸ (de Cell Signalling, Madrid, España) o anti-t-CREB¹¹⁹ (igualmente, de Cell Signalling, Madrid, España) y anti- β actina (Sigma Aldrich, Madrid, España). Tras lavar las membranas varias veces con solución tampón Tween 20-Tris, se incubaron durante 45 min los correspondientes anticuerpos secundarios quimioluminiscentes (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.). Finalmente, las membranas se revelaron gracias al "ECL Advance Western Blotting Detection Kit" (de GE Healthcare, Barcelona, España); la densitometría óptica de las bandas obtenidas se analizó y cuantificó gracias al programa informático Scion-Image (Informer Technologies Inc., Dallas, EE.UU.).

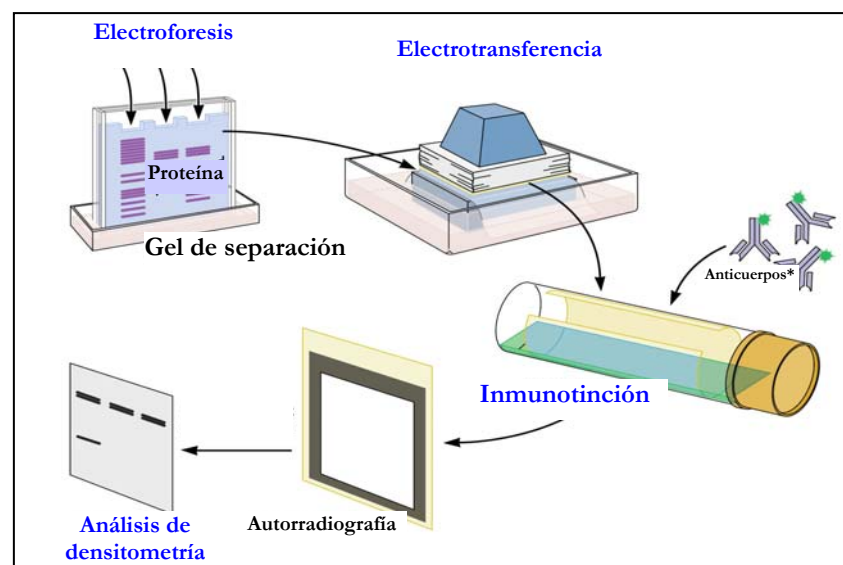


Fig. 30.- Esquema de la técnica de "western-blot".

Las proteínas de una muestra biológica, una vez separadas mediante electroforesis, se electrotransfieren a una membrana, la cual se somete a inmunotinción mediante el empleo de anticuerpos quimioluminiscentes (Anticuerpos*). La quimioluminiscencia se analiza.

Fuente: Modificado de <http://www.virology.ws/2010/07/07/virology-toolbox-the-western-blot/>

¹¹⁶ Anti-p-ERK: Anticuerpo contra la forma fosforilada de ERK

¹¹⁷ Anti-t-ERK: Anticuerpo contra ERK total

¹¹⁸ Anti-p-CREB: Anticuerpo contra la forma fosforilada de CREB

¹¹⁹ Anti-t-CREB: Anticuerpo contra CREB total

7.10 Exploración de la localización de proteínas y organelas mediante microscopía confocal

Con el fin de analizar la localización de componentes subcelulares, a saber, organelas y proteínas nos servimos de la microscopía confocal.

7.10.1. Fundamento de la técnica

La microscopía confocal (Fi. 31) es una tecnología que permite alcanzar una resolución visual de tal calidad que permite la observación de estructuras subcelulares.

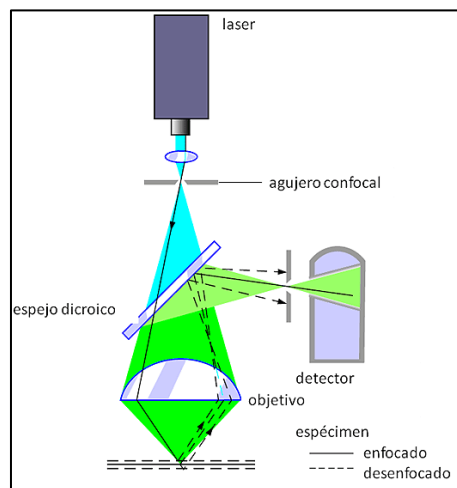


Fig. 31.- Esquema básico de un microscopio confocal de fluorescencia.

Un rayo de láser (luz azul) es emitido y dirigido a través de un agujero confocal y de un espejo dicróico y posteriormente enfocado mediante un objetivo hacia la muestra, donde se estimulan moléculas fluorescentes. La fluorescencia emitida por la muestra (luz verde) se recoge a través del objetivo y se dirige mediante un espejo dicróico al detector, el cual puede ser una cámara de vídeo; justo antes del detector, se coloca un segundo filtro con un agujero que solo deja pasar la luz proveniente del plano de enfoque (línea continua), evitándose que la fluorescencia de otros planos (líneas discontinuas) distorsione la imagen.

Fuente:

http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/capitulo6_7.htm

7.10.2 Procedimiento experimental

Tanto las células HeLa, como las células SH-SY5Y, se sembraron en cubreobjetos de 12 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania), dispuestos en placas Corning de 24 pocillos (Corning, EE.UU.) a una densidad de 5×10^4

células/pocillo; en el caso de las células SH-SY5Y, los cubreobjetos se trataron con poli-L-lisina (Sigma Aldrich, Madrid, España), previamente a la siembra. Posteriormente, se hicieron las transfecciones mediante liposomas, tal y como se describió anteriormente, utilizando 0,5 µg del ADNc de pcDNA3.1, CALHM1 o P86L-CALHM1³ para los estudios de localización de organelas, además de estos ADNc se utilizaron como marcador del RE una proteína fluorescente verde, GFP, dirigida a RE (RE-GFP¹²⁰) y para la mitocondria, una proteína fluorescente roja dirigida a la misma (mit-RFP¹²¹, acrónimo del inglés "mitochondrial-Red Fluorescent Protein"), siendo ambos ADNc una gentil cesión del Laboratorio del Prof. Tullio Pozzan (Universidad de Padua, Italia).

24 h después de la transfección, se realizó una inmunotinción de las células, una vez que éstas habían sido lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído (al 4 %; de Sigma Aldrich, Madrid, España) y permeabilizadas (en su caso) con 0.1% TritonX-100 (Sigma Aldrich, Madrid, España) en PBS durante 5 min. Las células así fijadas se rehidrataron con PBS⁹¹ y se bloquearon 30 min con un compuesto que favorece la señal fluorescente como es el "Image-IT FX signal enhancer", de Fisher Scientific (Madrid, España). Posteriormente, se incubaron 30 min los anticuerpos primarios anti-c-Myc y anti-CALHM1 (ambos obtenidos de Millipore, Madrid, España) y, tras estos, los correspondientes anticuerpos secundarios fluorescentes (de Abcam, Cambridge, Inglaterra) y se tiñeron los núcleos con DAPI. Finalmente, las inmunotinciones se mantuvieron en PBS hasta que se montaron los cubreobjetos en portaobjetos usando como medio de montaje el "DAKO fluorescent mounting medium", de DAKO (Barcelona, España). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems, Barcelona, España) y se analizaron gracias a los programas informáticos LAS AF LITE (Leica Microsystems, Barcelona, España) e Image J (Bethesda, EE.UU.); para los estudios de colocalización, se utilizó el *plugin* JACoP (acrónimo inglés *Just Another Colocalization Plugin*), de la aplicación Image J.

¹²⁰ RE-GFP: Proteína fluorescente verde dirigida a retículo endoplásmico

¹²¹ mit-RFP: Proteína fluorescente roja dirigida a mitocondria

7.11 Análisis estadístico

Los valores de los resultados se muestran como la media \pm error estándar. Para las comparaciones de dos poblaciones, por ejemplo, tratados y sin tratar, se realizó una t-Student. Para las comparaciones de tres o más poblaciones, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA¹²²) y tras el cual se realizaron análisis estadísticos más finos como Bonferrony, Dunnett o Tukey.

Las diferencias significativas se consideraron cuando el valor $p < 0,05$, con una confianza del 95 %, de manera que $0,05 < p < 0,01$ se representa con 1 símbolo (*); si $0,01 < p < 0,001$ se representa con 2 símbolos (**) y si $p < 0,001$, se representa con 3 símbolos (***). En el caso de haber empleado como test estadístico la t-Student, la significación se representa con almohadillas (#).

¹²² ANOVA: Análisis de la varianza

8. RESULTADOS

8. RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados obtenidos a lo largo del presente Trabajo de Investigación.

8.1 Expresión y localización de CALHM1

Como se ha descrito a lo largo de esta Memoria, CALHM1 es un canal de Ca^{2+} de origen neural. Para estudiar un canal de Ca^{2+} , es especialmente ventajoso utilizar un modelo celular sencillo, no neuronal, que carezca de elementos que guarden un papel importante en la señalización del mencionado catión, como los CCDV o el mpNCX, que podrían enmascarar los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]$ mediados por CALHM1. Con este fin se emplearon las células HeLa, las cuales son, además, fácilmente transfectables. Sin embargo, para corroborar lo hallado y analizar el papel de CALHM1 en sus condiciones más fisiológicas, se ha hecho uso de dos modelos celulares algo más complejos: las líneas neuronales de neuroblastoma humano SH-SY5Y y de hipocampo de ratón HT-22.

8.1.1 Las células HeLa se transfectan eficazmente con CALHM1/P86L-CALHM1

Para demostrar la eficacia tanto de la transfección de CALHM1/P86L-CALHM1 como su co-transfección junto a otros ADNc, se realizaron 2 estrategias, a saber, detección de CALHM1 mediante "western blot" y visualización de la co-transfección con GFP. Los experimentos funcionales, realizados en paralelo, mostraron la eficiencia de la transfección.

Para comenzar, las células HeLa transfectadas con 0,5 μg del ADNc del vector vacío (pcDNA 3.1), y los que codifican para CALHM1¹ o P86L-CALHM1

fueron sometidas a una inmunodetección por "western blot" del epítipo c-Myc presente en el vector. En la Fig. 32 se muestra el resultado del mismo: CALHM1 y P86L-CALHM1 se expresaron muy eficazmente en las células HeLa, siendo su masa molecular de unos 40 kDa.

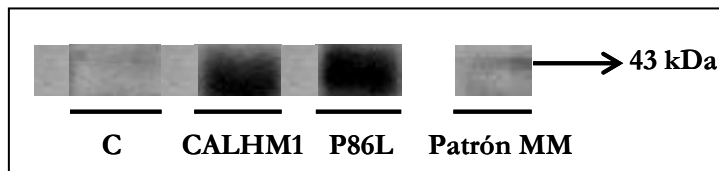


Fig. 32.- **Inmunodetección indirecta de CALHM1 mediante "western blot".**

Ejemplo de bandas obtenidas tras la realización de un "western blot" a células HeLa transfectadas con el ADNc del vector vacío (pcDNA3.1; C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L). Se utilizó como anticuerpo primario anti-c-Myc, presente en el vector plasmídico del canal. El patrón de masa molecular (MM) indica que la proteína detectada es de unos 40 kDa.

Posteriormente, se realizó una co-transfección utilizando 0,75 μ g del ADNc del vector vacío (pcDNA 3.1), CALHM1 o P86L-CALHM1 junto con 0,75 μ g del ADNc de la GFP. La visualización de las células en un microscopio de epifluorescencia (BX51WI, Olympus, Japón) permitió estimar que la co-transfección del canal tiene un rendimiento de un 80 %, asumiendo que toda célula positiva para GFP lo es también para la otra proteína transfectada (Fig. 33). Curiosamente, las células co-transfectadas con el vector vacío presentaron un aspecto deteriorado, apareciendo células redondeadas y muertas y, con una expresión de GFP poco homogénea; ello puede ser debido a que este ADNc es expresado tan eficazmente por las células que resulta tóxico.

Así, establecimos las condiciones óptimas de transfección y co-transfección de CALHM1¹/P86L-CALHM1⁸ para la realización de los siguientes experimentos.

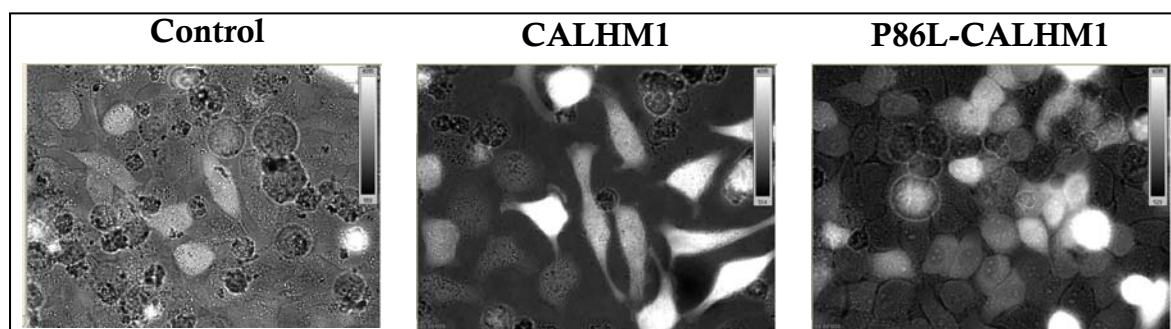


Fig. 33.- **Rendimiento de la co-transfección de CALHM1/P86L-CALHM1 con GFP.**

Visualización en luz transmitida y con fluorescencia ($\lambda = 592$ nm) de células HeLa transfectadas con GFP y con el vector vacío (Control), CALHM1 o P86L-CALHM1. (x600).

8.1.2 CALHM1/P86L-CALHM1 se localizan fundamentalmente en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico

Cuando fue descrito CALHM1, se postuló la localización del canal en la membrana plasmática y en el RE; ello fue a partir de una tinción inmunofluorescente en células CHO transfectadas con CALHM1 (Dreses-Werringloer y col., 2008) y de la expresión del canal en ovocitos de *Xenopus* (Ma y col., 2012). Sin embargo, quisimos analizar la localización subcelular de CALHM1 en los modelos experimentales que emplearíamos posteriormente en nuestros experimentos.

Los primeros estudios para determinar la localización de CALHM1 los realizamos en las células HeLa mediante dos tipos de tinciones inmunofluorescentes: mientras que en la primera de ellas no se permeabilizaron las células, con el fin de determinar si CALHM1/P86L-CALHM1 son canales de membrana plasmática, en la segunda inmunotinción se permeabilizaron las células, para poder visualizar la localización intracelular del canal. Tal y como aparece en la Fig. 34a, se aprecia en las células transfectadas con CALHM1 y con P86L-CALHM1 un claro marcaje verde en el exterior celular, en todo caso superior al presente en las células control y compatible con la unión del anticuerpo a la superficie celular. Por otra parte, en la Fig. 34b, se observa que en las células permeabilizadas, el anticuerpo penetra en las células, quedándose unido a estructuras de tipo reticular, que bien pudiera ser el RE.

Posteriormente, fue preciso averiguar si en un modelo celular de tipo neuronal, CALHM1/P86L-CALHM1 se expresaban de manera similar. Así, en la línea SH-SY5Y, se realizaron una serie de tinciones inmunofluorescentes (Fig. 35), en las que se aprecia que ambos canales se localizan, por una parte, en la superficie celular y, por otra parte, en el interior celular, siguiendo un patrón de tipo reticular; incluso, se puede advertir la localización alrededor del núcleo formando parte de la envoltura nuclear, la cual es una especialización del RE. Tal y como fue descrito por el grupo del Dr. Marambaud (Dreses-Werringloer y col., 2008), las células SH-SY5Y, en su forma indiferenciada, carecen del canal (Fig. 35, Control).

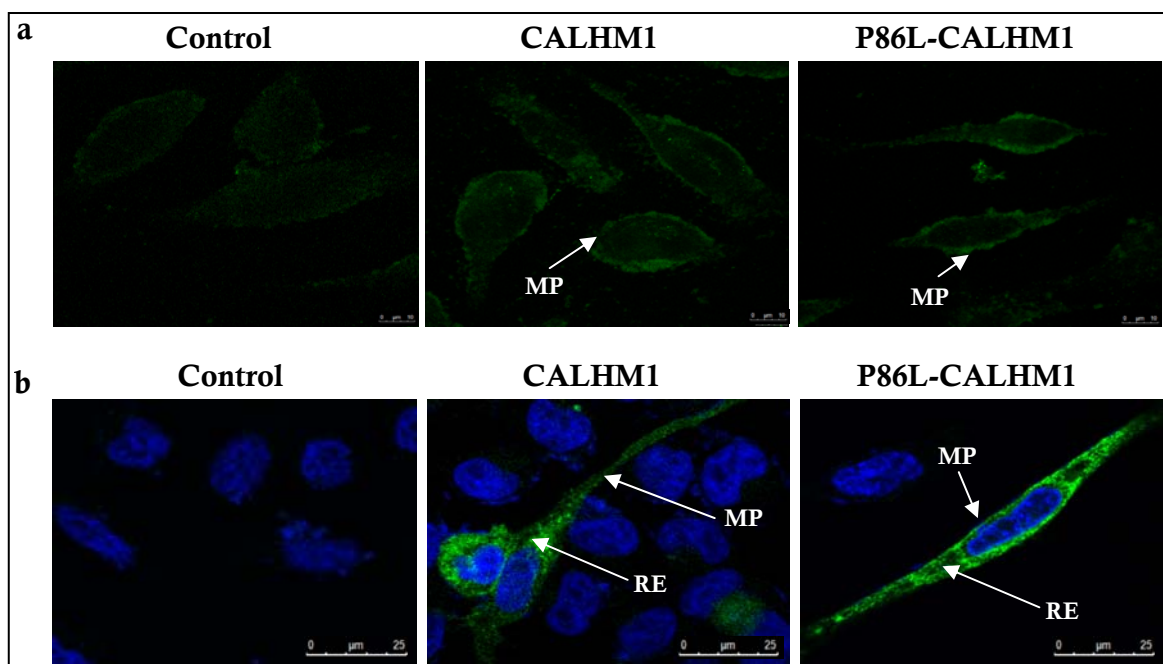


Fig. 34.- Localización de CALHM1 en las células HeLa

Tinciones inmunofluorescentes de células HeLa transfectadas con el vector vacío (Control), CALHM1 o P86L-CALHM1, en condiciones de células enteras (a) o permeabilizadas (b).

Los anticuerpos primarios empleados fueron anti-CALHM1 (a), o anti-c-Myc (b). Los núcleos (en azul) se tiñeron con DAPI. Se pueden diferenciar el marcaje en la membrana plasmática (MP) y en el retículo endoplásmico (RE).

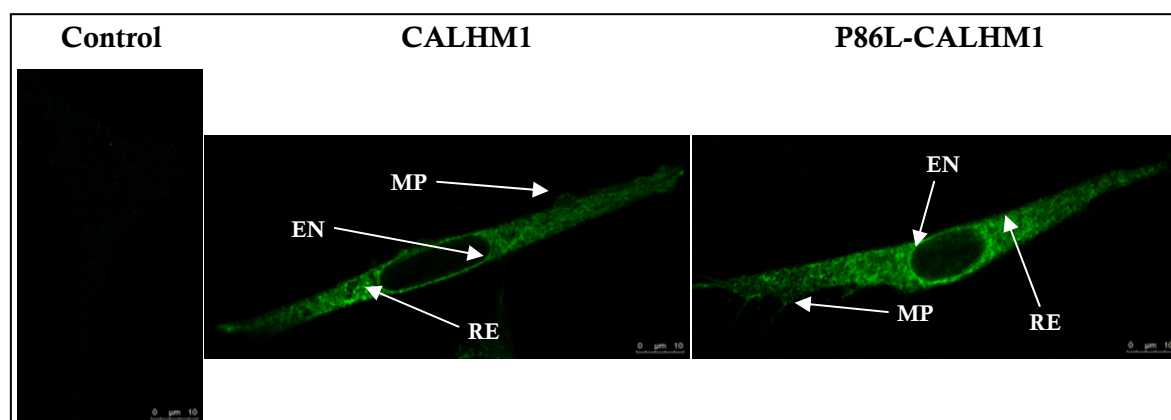


Fig. 35.- Localización de CALHM1 en SH-SY5Y

Tinciones inmunofluorescentes de células SH-SY5Y transfectadas con el vector vacío (Control), CALHM1 o P86L-CALHM1. El anticuerpo primario reconocía el epítipo c-Myc. El marcaje se distingue en la membrana plasmática (MP), el retículo endoplásmico (RE) e incluso la envoltura nuclear (EN).

Después, se procedió a analizar el anclaje intracelular de CALHM1/P86L-CALHM1 en las células de neuroblastoma SH-SY5Y.

En un primer momento, se investigó si CALHM1/P86L-CALHM1 se presentaban en las membranas mitocondriales. Para ello, se transfectaron células

SH-SY5Y con 0,5 μg del ADNc codificante del canal y 0,5 μg del ADNc que codifica para una proteína fluorescente roja dirigida a la mitocondria (**mit-RFP**), posteriormente, se realizó una inmunotinción del **canal**, en la que el anticuerpo secundario llevaba conjugado un fluoróforo verde. La co-localización del canal con las mitocondrias se visualizó en un microscopio confocal (Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems, Barcelona, España)), en el que se igualaron las intensidades de las fluorescencias y se determinó cualitativamente, diferenciando el color de la mitocondrias, en función del algoritmo mostrado en la Fig. 36.

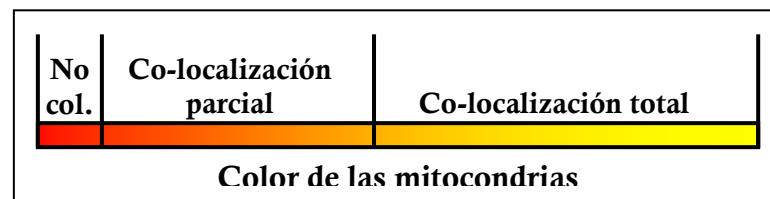


Fig. 36.- **Algoritmo de colores empleado para estudiar la co-localización.**
En función del color de las mitocondrias se puede inferir si no hay co-localización (No col.), o si se da co-localización parcial o total con las mismas.

Así pues, en la composición de las imágenes formada por las **mitocondrias** y el **canal**, nos podemos encontrar con tres situaciones:

- mitocondrias completamente **rojas**: no hay co-localización
- mitocondrias **naranjas**: hay una co-localización parcial
- mitocondrias completamente **amarillas**: hay una co-localización total.

Dado que se pueden apreciar diferencias a lo largo de toda la red mitocondrial presente en cada célula, se eligió el color predominante en cada imagen.

Tras analizar 90 células procedentes de 6 cultivos distintos, se obtuvo que en un 52,22 % de las mismas, la forma nativa del canal CALHM1 colocalizaba parcialmente con las mitocondrias (Fig. 37a), mientras que la forma mutada P86L-CALHM1 lo hacía en un 61,04 % de los casos (77 células de 6 cultivos distintos) (Fig. 37b), y dicha co-localización fue superior a la de CALHM1 (las mitocondrias tendían a ser más amarillentas); además, la presencia de P86L-CALHM1 conllevó a una mayor aparición de mitocondrias fragmentadas.

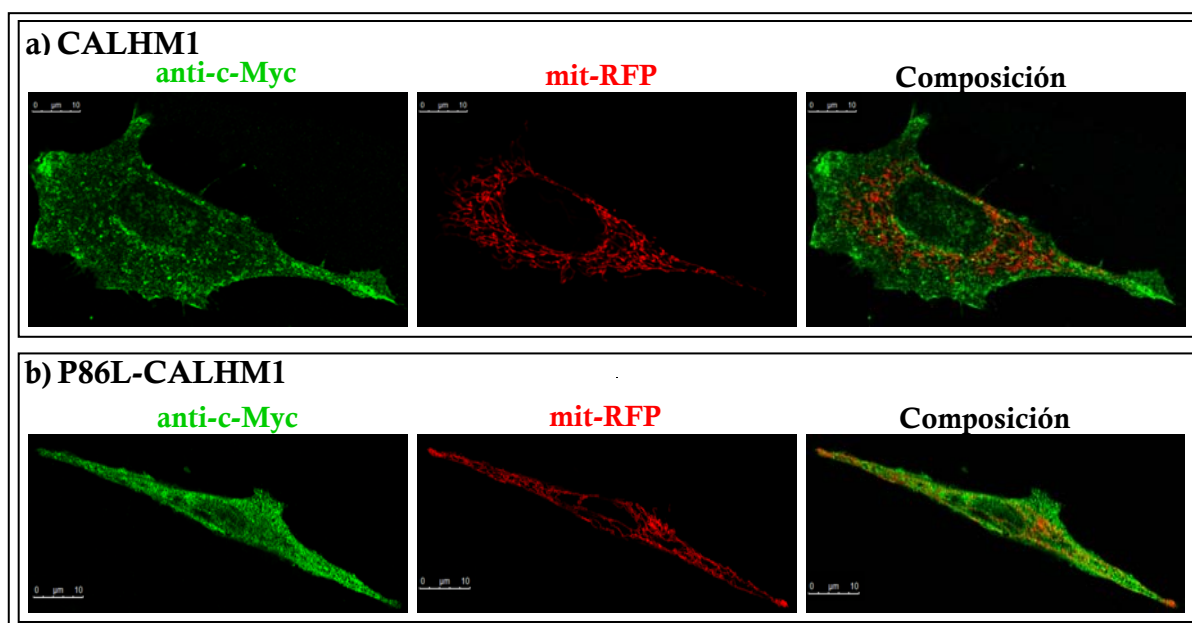


Fig. 37.- **CALHM1 colocaliza parcialmente con las mitocondrias.**
Inmunofluorescencia de células SH-SY5Y transfectadas con CALHM1 (a) o P86L-CALHM1 (b) y la proteína fluorescente roja dirigida a mitocondria mit-RFP. La composición muestra distintos tonos anaranjados de las mitocondrias, indicando co-localización entre el canal y las mismas.

Posteriormente, se procedió a comprobar si CALHM1/P86L-CALHM1 se encontraban localizados en el RE, tal y como se ha inferido en ocasiones anteriores. Para ello, se realizaron dos estrategias: *i*) una doble inmunotinción para **CALHM1** (el anticuerpo secundario llevaba acoplado un fluoróforo verde) y para una proteína residente en el lumen reticular (**calreticulina**; el anticuerpo secundario llevaba acoplado un fluoróforo rojo) y *ii*) una inmunotinción para **CALHM1** (el anticuerpo secundario llevaba acoplado un fluoróforo rojo) en células co-transfectadas con una proteína fluorescente verde dirigida a la membrana del RE (**RE-GFP**). En ambos casos, se obtuvieron imágenes de microscopía confocal, eligiéndose aquellas con iguales intensidades de fluorescencia. La co-localización del canal con el RE se determinó cualitativamente, diferenciando el color de este, siguiendo el algoritmo de la Fig. 38:

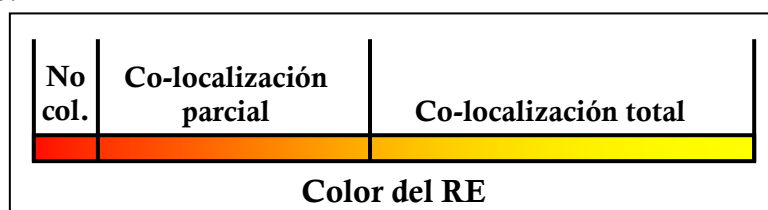


Fig. 38.- **Algoritmo de colores empleado para estudiar la co-localización.**
Según el color del retículo endoplásmico (RE) se puede inferir si no hay co-localización (No col.), o si aparece co-localización parcial o total entre el canal y éste.

Igualmente a lo explicado anteriormente, el color rojo indica la ausencia de co-localización; el color naranja indica una co-localización parcial y el amarillo, una co-localización total entre el RE y el canal. Se escogió, para cada célula, el color más representativo.

Analizando las 26 células (de 2 cultivos distintos), se observó que en el 96,15 %, CALHM1 colocalizaba con la calreticulina, obteniendo una co-localización total en el 53 % de los casos. P86L-CALHM1 colocalizó con la calreticulina en un 91,67 % de las 12 células analizadas (de 2 cultivos distintos), siendo la co-localización total en el 58,33 % de ellas (Fig. 39).

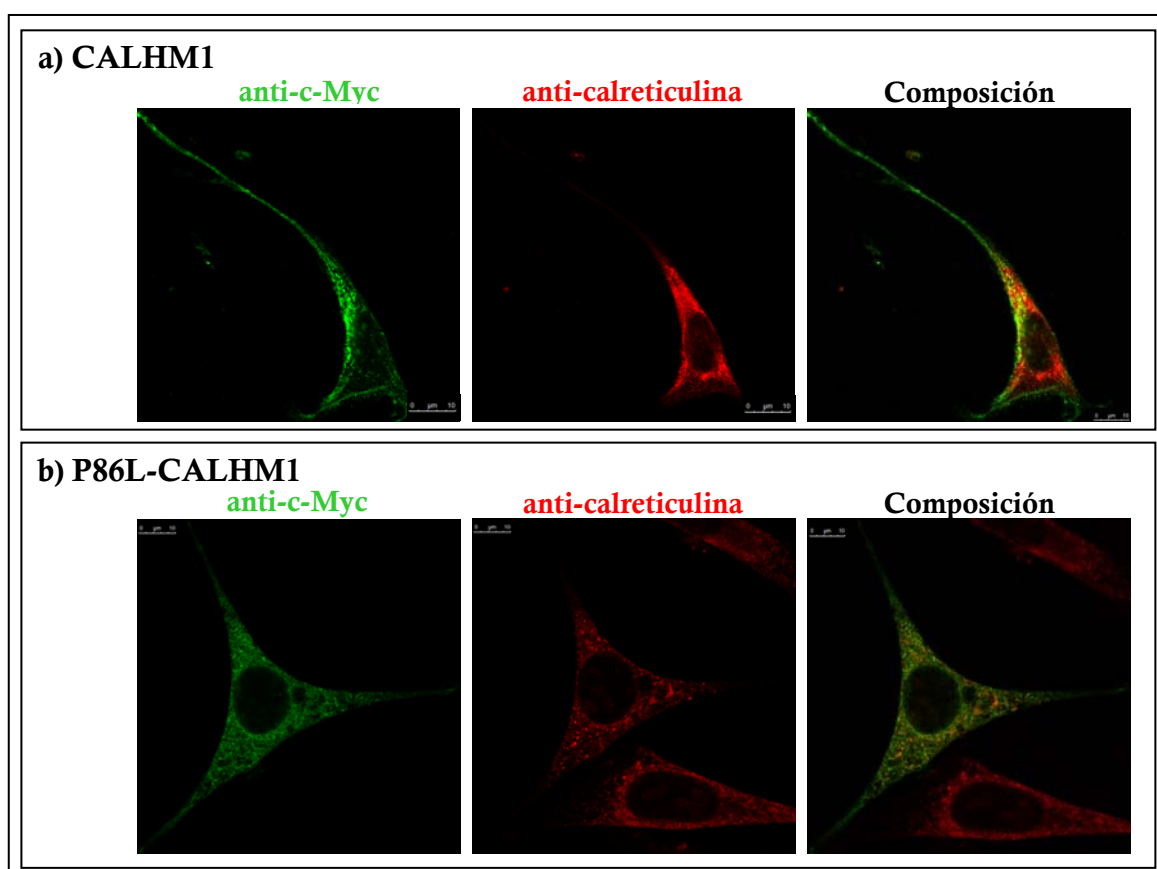


Fig. 39.- **CALHM1 colocaliza con una proteína residente en el lumen del RE.**
Doble tinción inmunofluorescente para CALHM1 (a)/P86L-CALHM1 (b) y calreticulina.
Los tonos anaranjados-amarillentos de la composición muestran que el canal se halla localizado en el RE.

Dado que la señal fluorescente de la calreticulina era demasiado baja como para poder compararla con la señal del epítipo c-Myc (CALHM1) y aparecía muy frecuentemente conformado concreciones, se procedió a utilizar RE-GFP. Así, en el 100 % de las 52 células analizadas (de 2 cultivos), RE-GFP colocalizaba con CALHM1, siendo la co-localización total en 50 de las 52 células (96,15 %). Por su

parte, todas las 43 células que expresaban P86L-CALHM1 presentaron una co-localización de éste con RE-GFP, apareciendo una co-localización total en el 93,02 % de las células. El marcaje del canal se extendió en las células más allá de la señal de RE-GFP hacia la superficie celular (Fig. 40).

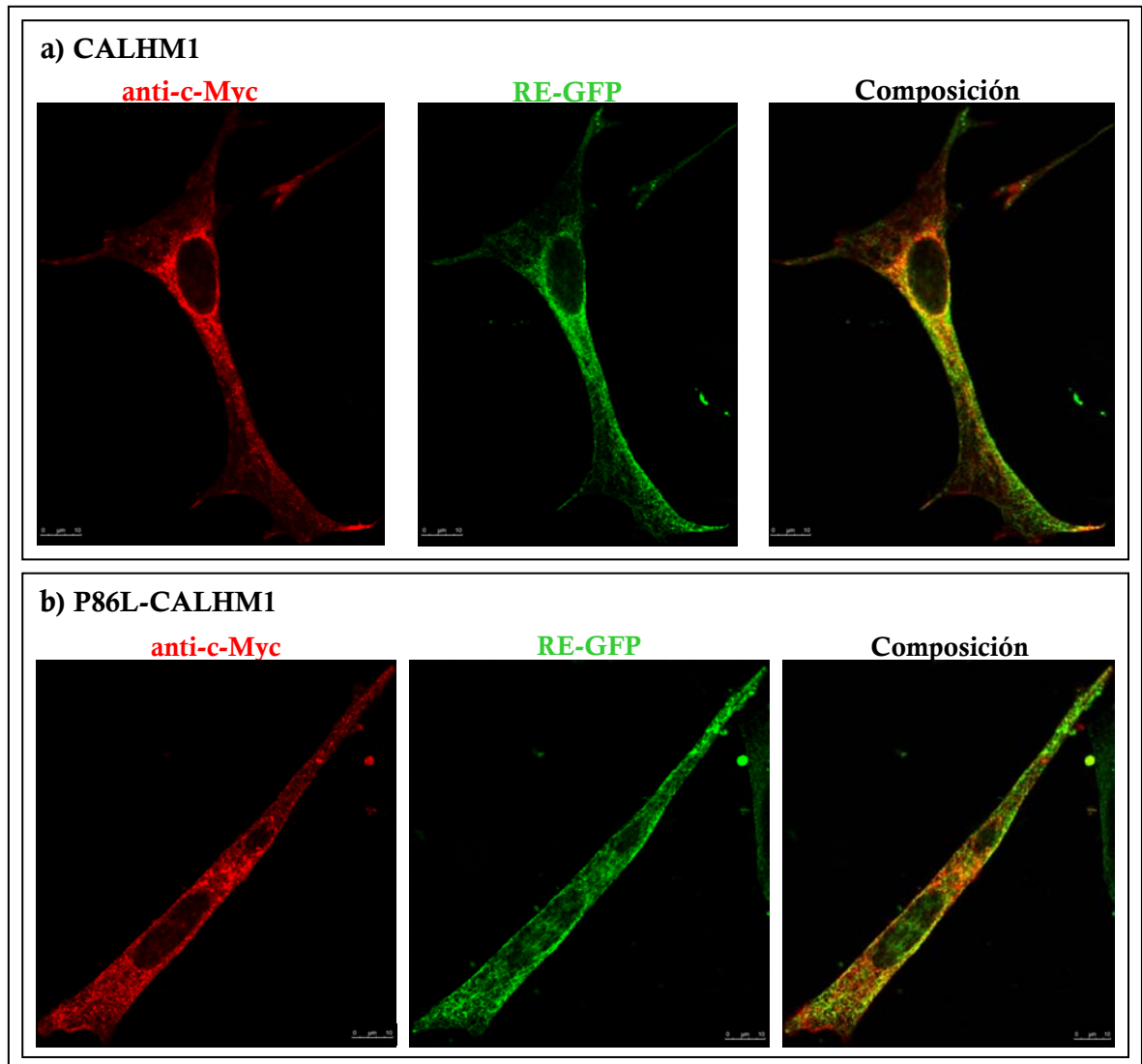


Fig. 40- CALHM1 colocaliza con una proteína transmembranal del RE.
Tinción inmunofluorescente para CALHM1 (a)/P86L-CALHM1 (b) en células co-transfectadas con RE-GFP. Los tonos anaranjados-amarillentos de la composición demuestran que el canal se halla localizado en el RE, junto al trazador de la organela.

8.2. CALHM1 y P86L-CALHM1 generan distintas señales intracelulares de Ca^{2+}

Para el estudio de la homeostasia del Ca^{2+} se han realizado medidas de Ca^{2+} mediante técnicas de bioluminiscencia, gracias al uso de las ecuorinas dirigidas genéticamente a cada organela de interés. Con el fin de corroborar los resultados obtenidos por otros autores (Dreses-Werringloer y col., 2008), se comenzó explorando el citosol.

8.2.1 Señales de Ca^{2+} citosólico mediadas por CALHM1 y P86L-CALHM1

En primer lugar, se determinaron en nuestro modelo celular, HeLa, las señales de Ca^{2+} citosólico inducidas por el canal nativo y mutado. Utilizando para ello la ecuorina dirigida genéticamente a citosol (Fig. 21), se realizaron los experimentos de reintroducción de Ca^{2+} que anteriormente habían demostrado ser la señal de activación de CALHM1 (Dreses-Werringloer y col., 2008). Dicho protocolo consiste en la perfusión de las células con una solución salina (Krebs-HEPES) con 0 mM Ca^{2+} y 0,5 mM EGTA, durante 2 minutos, tras los cuales se reintroduce otra solución Krebs-HEPES que contiene una $[\text{Ca}^{2+}]$ fisiológica, que para las células no excitables es de 1 mM Ca^{2+} . En estas condiciones, CALHM1 presenta una máxima conducción de Ca^{2+} a su través.

Tal y como se muestra en la Figs. 41, la reintroducción de Ca^{2+} en células transfectadas con el vector vacío provocó una leve y transitoria señal de Ca^{2+} citosólica, alcanzándose un aumento del pico máximo de $1,479 \pm 0,325 \mu\text{M}$ (Fig. 42a), y un área bajo la curva, ABC^{123} , de $31,29 \pm 5,669 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ (Fig. 42b)), con unas constantes de tiempo de activación, τ_{act}^{124} , de $3,868 \pm 0,584 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ (Fig. 42c) y de inactivación, $\tau_{\text{inact}}^{125}$, de $17,49 \pm 2,009 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ (Fig. 42d). Por su parte, en las células transfectadas con CALHM1, se apreció una señal de Ca^{2+} mucho mayor, especialmente en amplitud, pues el pico máximo aumentó hasta $7,205 \pm 0,591 \mu\text{M}$ (Fig. 42c), mientras que el Ca^{2+} total que entró en la célula por unidad de tiempo

¹²³ ABC: Área bajo la curva, concentración total de Ca^{2+} por unidad de tiempo

¹²⁴ τ_{act} : Constante de tiempo de activación

¹²⁵ τ_{inact} : Constante de tiempo de inactivación

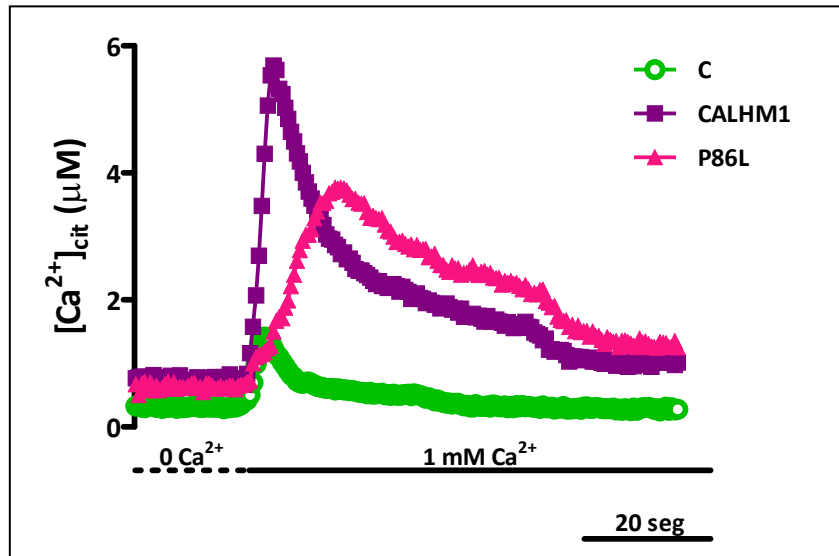


Fig. 41.- Transientes de Ca^{2+} citosólicos tras un protocolo de reintroducción de Ca^{2+} . Extracto del registro de la medida de Ca^{2+} citosólico en células HeLa co-transfectadas con eucorina citosólica y el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L) que fueron sometidas a un protocolo de reintroducción de Ca^{2+} mediante el intercambio de solución sin Ca^{2+} y con 0,5 mM de EGTA (0 Ca^{2+}) a otra que contenía 1 mM Ca^{2+} .

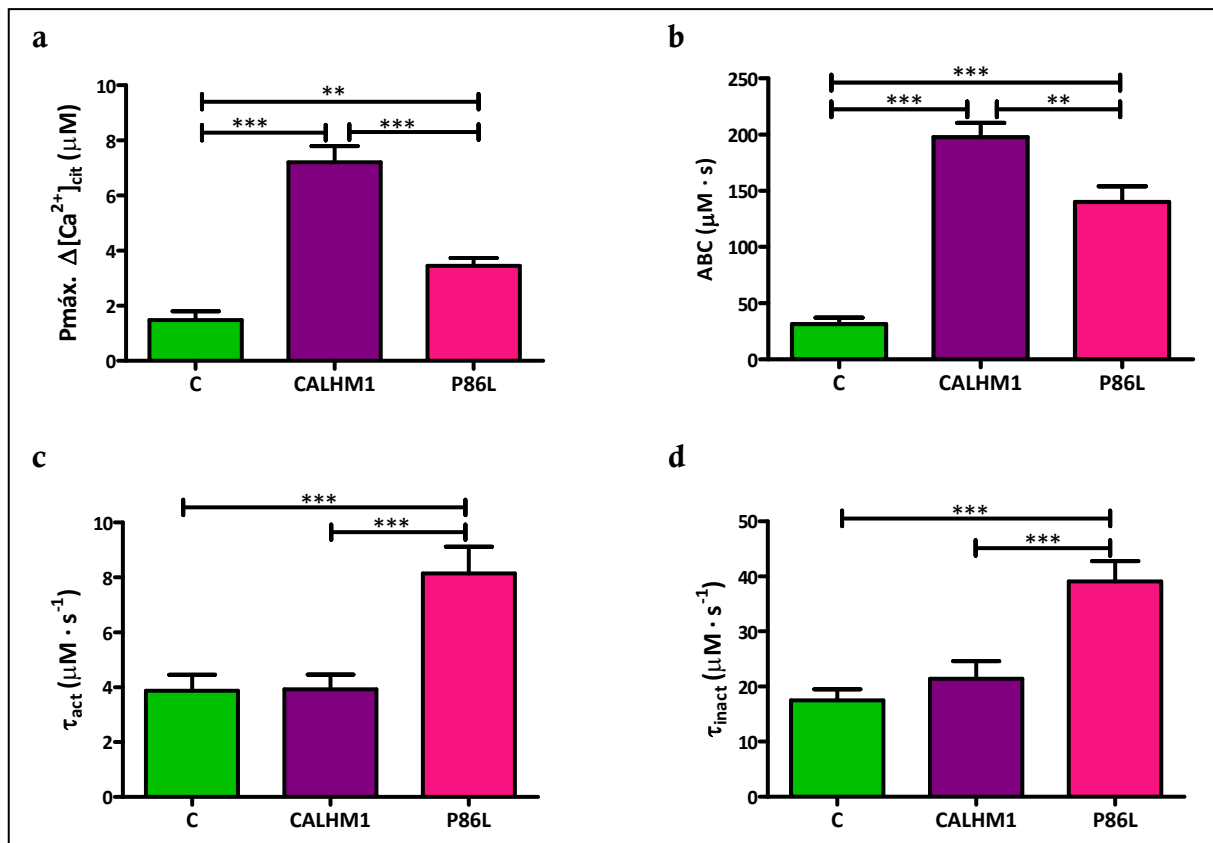


Fig. 42.- Estudio de los parámetros cinéticos de la señal de Ca^{2+} .

a) Pico máximo de la amplitud de la señal de Ca^{2+} citosólico; b) Cantidad de Ca^{2+} en el citosol por unidad de tiempo, expresado como el área bajo la curva, ABC, del transiente; c) y d) respectivamente, constante de tiempo de activación, τ_{act} , y de inactivación, τ_{inact} , de la señal de Ca^{2+} en células HeLa co-transfectadas con la eucorina citosólica y el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L).

Datos obtenidos de 28 experimentos procedentes de 10 cultivos distintos. ANOVA y Bonferroni como post-análisis, siendo $**=p<0,01$ y $***=p<0,001$.

fue de $197,8 \pm 12,58 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ (Fig. 42 b), siendo las τ_{act} y τ_{inact} similares a las de las células control (Fig. 42c y d). En cambio, en las células transfectadas con el polimorfismo P86L-CALHM1, se advirtió una elevación del Ca^{2+} citosólico intermedia, tanto en pico ($3,458 \pm 0,272 \mu\text{M}$, Fig. 42a), como en ABC $140,1 \pm 13,90 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ (Fig. 42c), pero la entrada y la salida del Ca^{2+} al citosol fueron muy lentas, con una τ_{act} de $8,143 \pm 0,98 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ (Fig. 42c) y una τ_{inact} de $39,06 \pm 3,692 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ (Fig. 42d), estadísticamente muy superior.

8.2.2 Señales de Ca^{2+} mitocondrial inducidas por CALHM1/P86L-CALHM1

Dado que la mitocondria ejerce un papel fundamental en la regulación de la homeostasia del Ca^{2+} , al comportarse como un tamponador transitorio, resultó de interés explorar cómo la mitocondria detectaba el Ca^{2+} que entra a través de los canales CALHM1/P86L-CALHM1 expresados en la membrana plasmática. Para ello, se realizó el protocolo experimental de activación del canal mediante la reintroducción de Ca^{2+} , descrito anteriormente, pero en células a las que se había co-transfectado una ecuorina, esta vez dirigida a la matriz mitocondrial (Fig. 21). En la Fig. 43 se ejemplifican los transientes obtenidos en estas nuevas condiciones de experimentación, los cuales son similares a lo obtenido en el citosol (Fig. 41).

Analizando los parámetros cinéticos, las células transfectadas con el vector vacío generaron un transiente de Ca^{2+} acumulado de $33,26 \pm 6,698 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ (Fig. 44b), siendo su pico máximo de $1,616 \pm 0,371 \mu\text{M}$ (Fig. 44a) y su τ_{act} y τ_{inact} $4,095 \pm 0,6902 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ (Fig. 44c) y $17,39 \pm 2,308 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ (Fig. 44d), respectivamente. Al igual que ocurre en el citosol, CALHM1 indujo una entrada de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial mucho mayor de $197,7 \pm 14,74 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ (Fig. 44b), siendo el pico máximo de la elevación de Ca^{2+} $7,846 \pm 0,63 \mu\text{M}$ (Fig. 44a) y las τ_{act} y τ_{inact} , muy similares a las células control (Fig. 44c y d). Por su parte, P86L-CALHM1 generó de nuevo una señal de Ca^{2+} intermedia, aunque cercana a la forma nativa del canal, con un ABC de $149,4 \pm 15,64 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ (Fig. 44b) y pico máximo de $2,671 \pm 0,2941 \mu\text{M}$ (Fig. 44a). Sin embargo, las cinéticas de activación y, sobretudo, de inactivación en presencia de P86L-CALHM1, se vieron claramente enlentecidas: τ_{act} de $7,187 \pm 0,978 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ (Fig. 44c) y τ_{inact} de $40,06 \pm 4,77 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ (Fig. 44d).

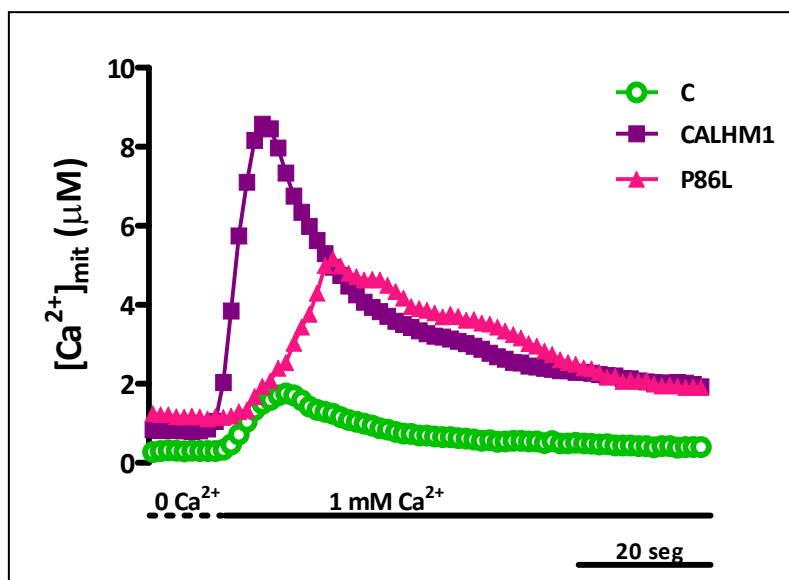


Fig. 43.- Registros típicos (extracto) de Ca^{2+} mitocondrial tras una reintroducción de Ca^{2+} en presencia de CALHM1/P86L-CALHM1.

La reintroducción de Ca^{2+} se consiguió intercambiando la solución extracelular sin Ca^{2+} y con 0,5 mM de EGTA (0 Ca^{2+}) a otra que contenía 1 mM Ca^{2+} en células HeLa co-transfectadas con la ecurina mitocondrial y el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L).

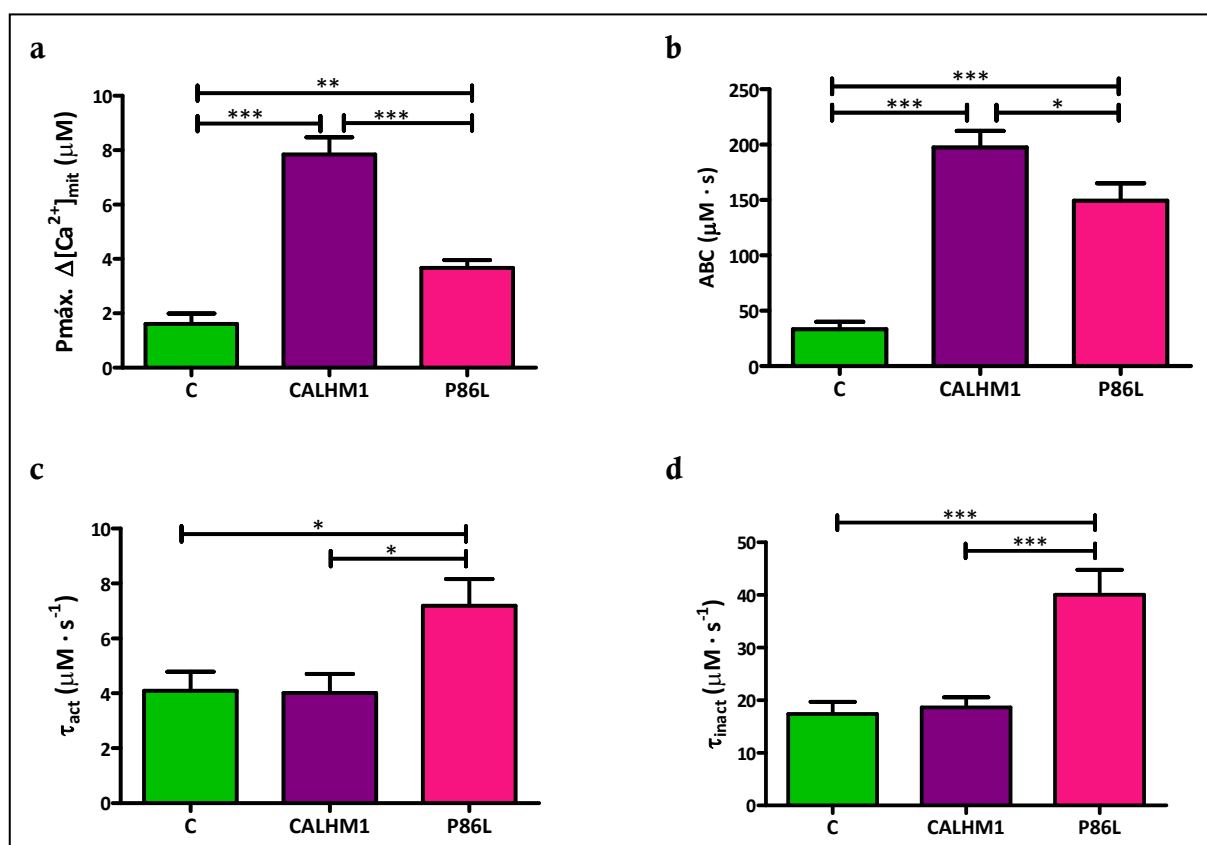


Fig. 44.- Estudio de los parámetros cinéticos de la señal de Ca^{2+} .

a) Pico máximo de la amplitud de la señal de Ca^{2+} mitocondrial; b) Cantidad de Ca^{2+} por unidad de tiempo, o área bajo la curva del transiente, ABC; c) Constante de tiempo de activación, τ_{act} , y d) Constante de tiempo de inactivación, τ_{inact} , de la señal de Ca^{2+} en células HeLa co-transfectadas con la ecurina mitocondrial y el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L).

Datos obtenidos de 25 experimentos procedentes de 7 cultivos diferentes. ANOVA y Bonferroni como post-análisis, siendo $*$ = $p<0,1$; $**$ = $p<0,01$ y $***$ = $p<0,001$.

8.2.3 Homeostasia del Ca^{2+} mitocondrial mediante la liberación de Ca^{2+} reticular en presencia de CALHM1/P86L-CALHM1

Habida cuenta de que el canal se encuentra expresado en el RE y que el RE y la mitocondria se encuentran conectados físicamente, el Ca^{2+} liberado por el RE es detectado de manera muy sensible por la mitocondria, realizamos experimentos para analizar la comunicación entre la mitocondria y el RE en presencia de CALHM1/P86L-CALHM1. Para ello, se utilizaron células HeLa contranfectadas con la ecuorina mitocondrial y el vector vacío, CALHM1 o P86L-CALHM1, a las que se administró un pulso de histamina (de 100 μM , 15 s), la cual, a través del mensajero intracelular IP_3 libera Ca^{2+} del RE rápidamente. Este Ca^{2+} fue detectado indirectamente con la ecuorina mitocondrial.

Mediante esta aproximación, se observó que tanto la forma nativa del canal, como su forma mutada P86L disminuyeron el contenido de Ca^{2+} del RE (Fig. 45), pues el Ca^{2+} total liberado (medido con el parámetro cinético ABC) por la histamina fue un 42,97 % menor en las células que expresan CALHM1 y un 49,94 % en las que expresan P86L-CALHM1, comparadas con las células control (Fig. 46b); además, la entrada y el aclaramiento del Ca^{2+} mitocondrial fueron más rápidos, siendo sus τ_{act} y τ_{inact} significativamente menores (Fig. 46c y d).

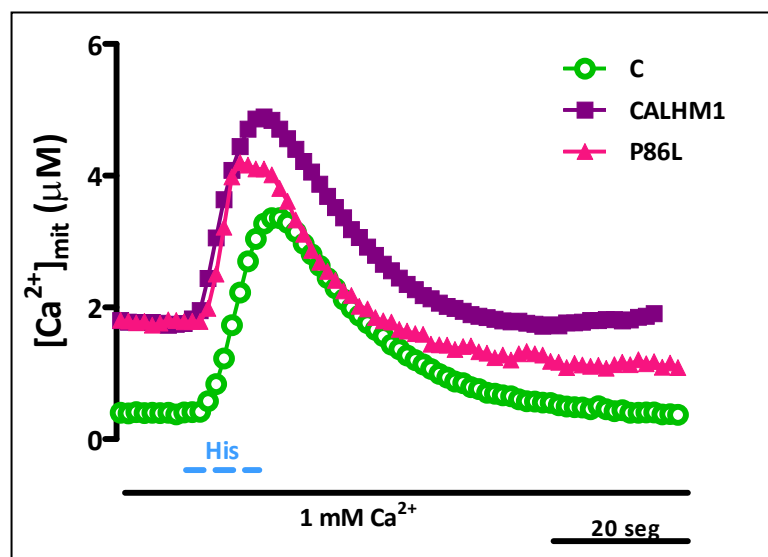


Fig. 45.- Liberación del Ca^{2+} reticular en presencia del canal.

Registros típicos de Ca^{2+} mitocondrial tras la liberación de Ca^{2+} del RE subsecuente a la administración de un pulso de histamina (His, 100 μM) en células HeLa co-transfectadas con la ecuorina mitocondrial y el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L).

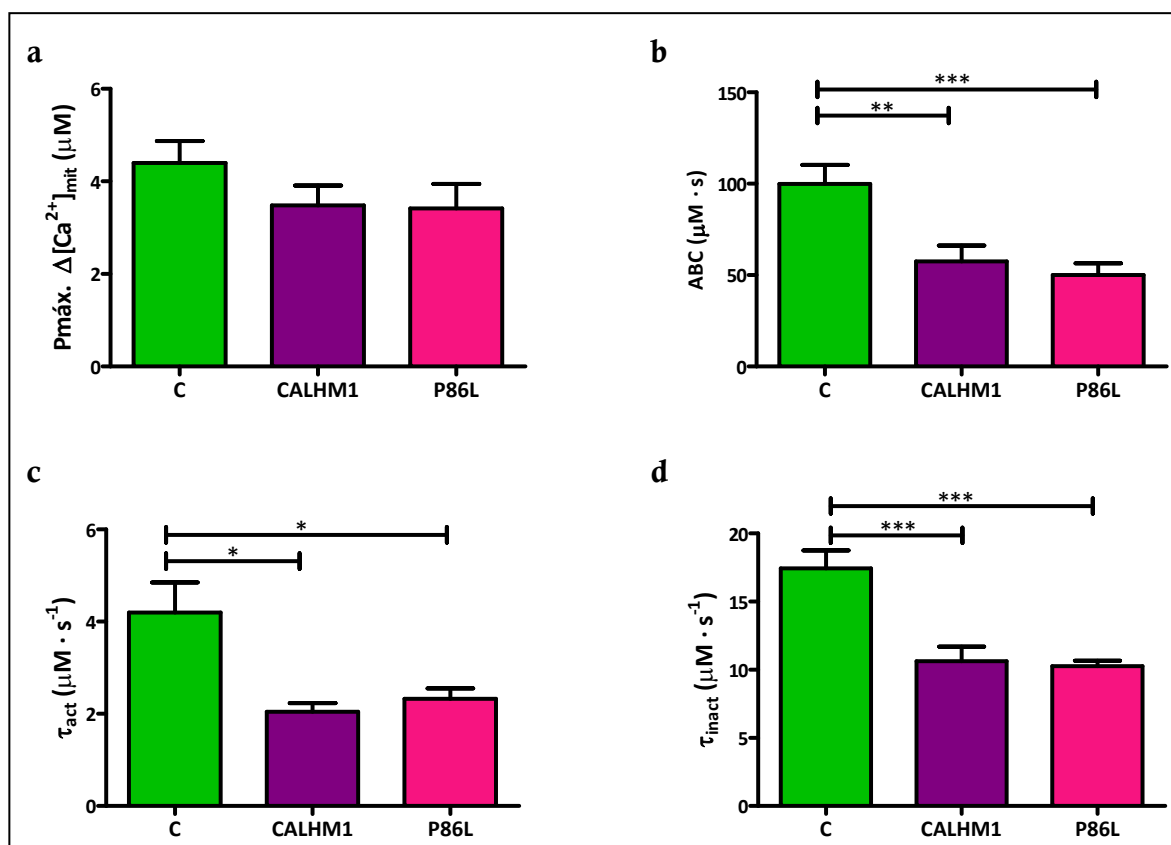


Fig. 46.- Estudio de los parámetros cinéticos de la señal de Ca^{2+} mitocondrial. a) Pico máximo de la amplitud de la señal de Ca^{2+} ; b) Cantidad de Ca^{2+} por unidad de tiempo, o área bajo la curva, ABC; c) Constante de tiempo de activación, τ_{act} , y d) Constante de tiempo de inactivación, τ_{inact} , de la señal de Ca^{2+} en células HeLa co-transfectadas con la ecuorina mitocondrial y el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L).

Datos obtenidos de 19 experimentos procedentes de 7 cultivos diferentes. ANOVA y Bonferroni como post-análisis, siendo $*=p<0,1$; $**=p<0,01$ y $***=p<0,001$.

8.2.4 Señales de Ca^{2+} nuclear en presencia de CALHM1/P86L-CALHM1

Otra organela clave en la homeostasia del Ca^{2+} y en los efectos a largo plazo de los transientes de Ca^{2+} es el núcleo. Con una gran dificultad, el estudio de la homeostasia del Ca^{2+} nuclear se realizó con células HeLa co-transfectadas con el canal y la ecuorina nuclear (Fig. 21). En estos experimentos, se realizó el mismo protocolo de reintroducción de Ca^{2+} que se había comprobado activaba la señalización de Ca^{2+} a través del canal (Fig. 41).

Tal y como se aprecia en los registros (Fig. 47), así como en el análisis posterior (Fig. 48a), en condiciones de 0 Ca^{2+} , la mera expresión del canal (tanto nativo,

como mutado) provoca un incremento de la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ basal de 4,98 veces en el caso de las células que expresan CALHM1 y de 3,98 veces, en aquéllas que expresan P86L-CALHM1, respecto a las células control.

Por otra parte, en presencia de CALHM1/P86L-CALHM1, la señal de Ca^{2+} nuclear subsecuente a la reintroducción de Ca^{2+} es mayor que la ocuriente en las células control. Así, la amplitud del pico máximo de la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ en las células control ascendió a $0,972 \pm 0,084 \mu M$, mientras que en presencia de CALHM1 fue a $2,790 \pm 0,128 \mu M$ y de P86L-CALHM1, a $2,317 \pm 0,159 \mu M$ (Fig. 48b). Por su parte, el área bajo la curva también se vio incrementada notablemente, de $27,61 \pm 2,533 \mu M \cdot s$ en las células control a $79,34 \pm 3,098 \mu M \cdot s$ en las células que expresaban CALHM1 y $83,58 \pm 6,157 \mu M \cdot s$ cuando se expresaba su polimorfismo P86L (Fig. 48c). Ello es debido a que la tasa de aclaramiento del Ca^{2+} nuclear se mantuvo constante el tiempo, en forma de meseta, lo que se demuestra con una τ_{inact} de $24,41 \pm 1,84 \mu M \cdot s^{-1}$ en presencia de CALHM1 y $23,79 \pm 3,809 \mu M \cdot s^{-1}$ en las células con P86L-CALHM1, en comparación a las células control ($6,961 \pm 0,939 \mu M \cdot s^{-1}$) (Fig. 48e). Por último, y tal y como ocurre con las señales citosólica (Fig. 41) y mitocondrial (Fig. 43), la entrada de Ca^{2+} al núcleo tras un protocolo de reintroducción de dicho catión fue significativamente mucho más lenta en el caso de las células que expresaban el polimorfismo P86L (2,27 veces con respecto a las células control y 1,54 veces, en comparación con las células que expresaban el canal nativo) (Fig. 48d).

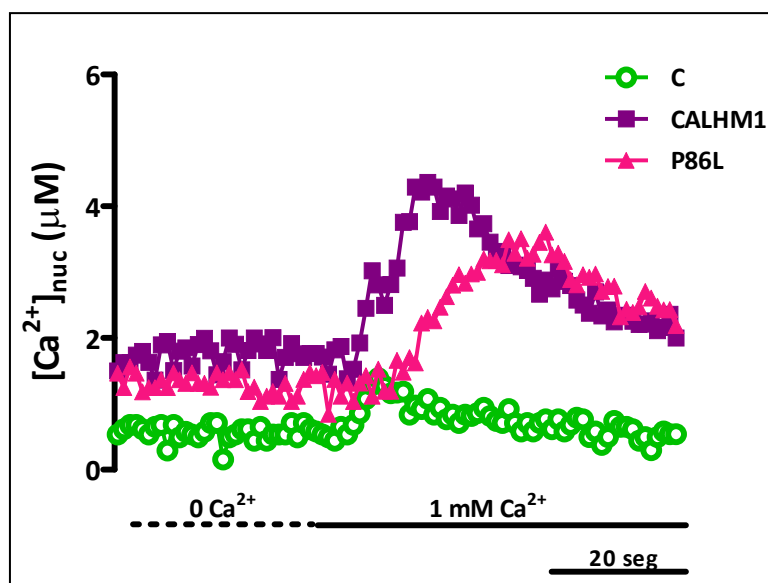


Fig. 47.- La reintroducción de Ca^{2+} también se refleja en el Ca^{2+} nuclear.

Fragmento de los registros típicos de Ca^{2+} nuclear en células HeLa co-transfectadas con la eucorina nuclear y el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L) a las que se ha sometido a un protocolo típico de reintroducción de Ca^{2+} .

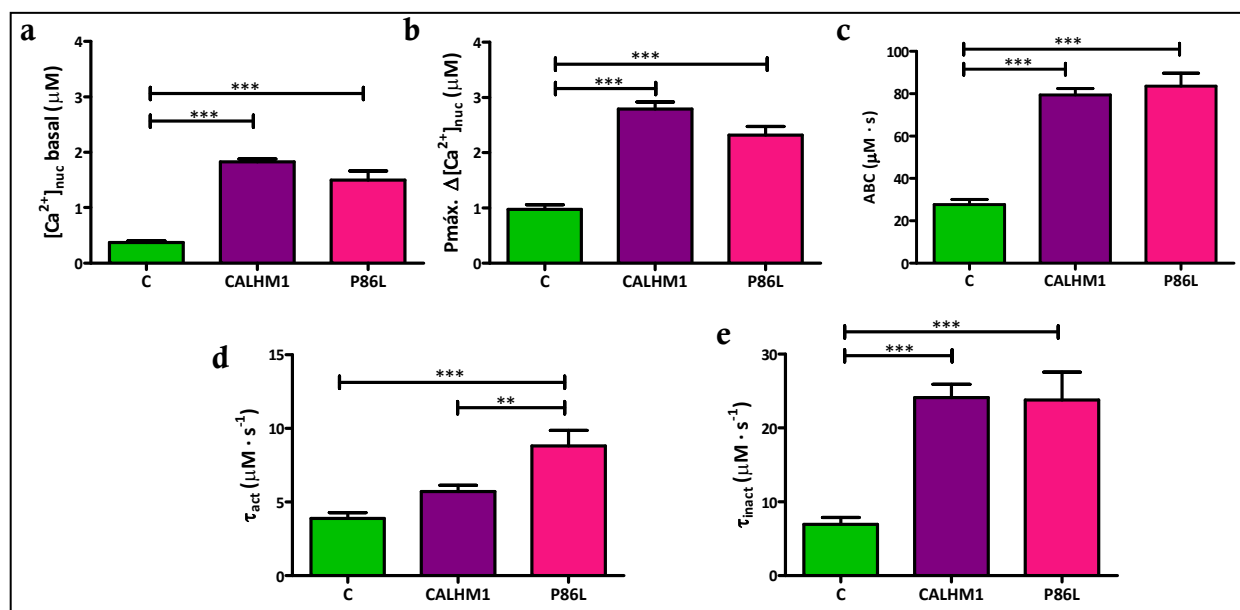


Fig. 48.- Análisis de parámetros cinéticos relevantes de la señal de Ca^{2+} nuclear.

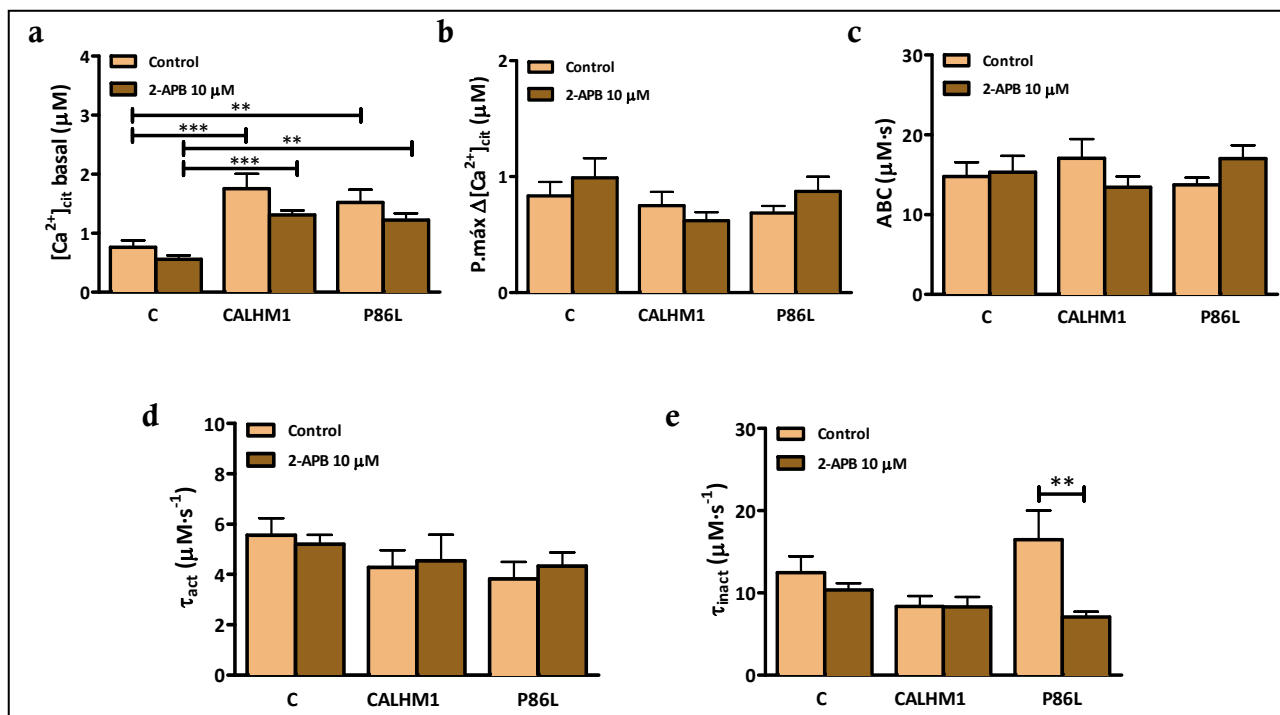
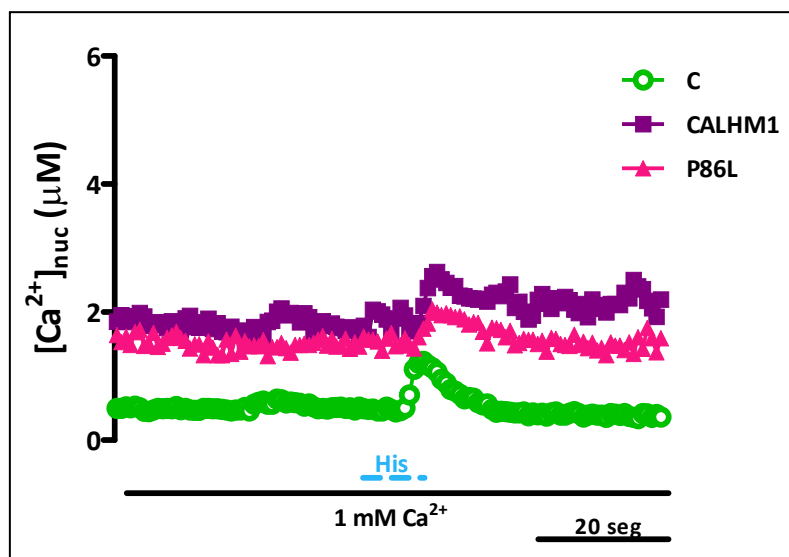
a) Concentración de Ca^{2+} nuclear ($[Ca^{2+}]_{nuc}$) basal durante el segundo minuto de registro; b) Pico máximo de la amplitud de la señal de Ca^{2+} nuclear; c) Área bajo la curva (ABC); d) y e)

Respectivamente, constantes de tiempo de activación, τ_{act} , y de inactivación, τ_{inact} , de la señal de Ca^{2+} en células HeLa co-transfectadas con la ecuorina nuclear y el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L).

Datos obtenidos de 18 experimentos procedentes de 10 cultivos diferentes. ANOVA y Bonferroni como post-análisis, siendo **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$.

A continuación, tratamos de averiguar si otros elementos clave en la homeostasia del Ca^{2+} nuclear como son los RIP_3 de la envoltura nuclear, se podrían hallar modulados por la presencia de CALHM1/P86L-CALHM1. Para ello, se estimularon los RIP_3 con histamina y se registró el Ca^{2+} del nucleoplasma con la ecuorina nuclear. En paralelo, para discernir esta posible relación entre los RIP_3 y el canal, se bloquearon los primeros con 2-APB (10 μM).

Al igual que ocurrió en los experimentos mostrados en la Fig. 47, la mera expresión de CALHM1/P86L-CALHM1 incrementó la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ basal, esta vez a una concentración fisiológica de $[Ca^{2+}]$ extracelular (1 mM). Así, en las células control la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ basal fue de $0,762 \pm 0,116 \mu M$, mientras que en las células que expresaban CALHM1 fue de $1,754 \pm 0,353 \mu M$ y en las que expresaban P86L-CALHM1, $1,522 \pm 0,215 \mu M$; estas mismas diferencias se mantuvieron constantes en presencia de 2-APB (Figs. 49 y 50a). En ninguno de los parámetros cinéticos analizados, se demostró relación alguna entre los RIP_3 y el canal, al no hallarse diferencias significativas. Por una parte, la administración de histamina provocó un



Datos de 10 experimentos procedentes de 4 cultivos diferentes en células sin tratar y 16 experimentos procedentes de 4 cultivos diferentes en células tratadas. ANOVA y Bonferroni como post-análisis, siendo $**=p<0,01$ y $***=p<0,001$. Comparaciones entre tratamientos realizadas con t-Student (no hay diferencias significativas).

incremento de $[Ca^{2+}]_{nuc}$ de $0,834 \pm 0,120 \mu M$ en las células control y de $0,989 \pm 0,1678 \mu M$ en las mismas tratadas con 2-APB; en presencia del canal nativo, tal incremento fue de $0,751 \pm 0,116 \mu M$ y de $0,621 \pm 0,072 \mu M$ con 2-APB y cuando P86L-CALHM1 se hallaba expresado, el incremento fue de $0,687 \pm 0,06 \mu M$ o de $0,873 \pm 0,127 \mu M$ cuando se perfundía 2-APB (Fig. 50b). Por otra parte, el Ca^{2+} total ingresado en las células control fue de $14,75 \pm 1,812 \mu M \cdot s$ (sin 2-APB) y de $15,31 \pm 2,046 \mu M \cdot s$ (con 2-APB); en las células que expresaban CALHM1, $17,07 \pm 2,392 \mu M \cdot s$ (sin 2-APB) y de $13,45 \pm 1,347 \mu M \cdot s$ (con 2-APB), mientras que en las células con el polimorfismo P86L, $13,70 \pm 0,948 \mu M \cdot s$ (sin 2-APB) y $17,04 \pm 1,659 \mu M \cdot s$ (con 2-APB) (Fig. 50c). Curiosamente, y para finalizar este estudio, el bloqueo de los RIP_3 redujo la tasa de aclaramiento del Ca^{2+} nuclear al 42,92 %, únicamente en las células que expresaban P86L-CALHM1 (Fig. 50d).

En la siguiente sección, hemos realizado un estudio sistemático, empleando distintos compuestos, con el objetivo de encontrar un compuesto modulador de las señales de Ca^{2+} inducidas por CALHM1/P86L-CALHM1 descritas hasta el momento.

8.3 Búsqueda de moduladores de las señales de Ca^{2+} inducidas por CALHM1 y P86L-CALHM1

Entre los Objetivos de esta Tesis, se encuentra la búsqueda de un modulador farmacológico del canal que, por una parte sirviera como herramienta farmacológica para estudiar las propiedades farmacológicas de CALHM1 y, por otra parte, como posible herramienta terapéutica que subsanara el efecto de la mutación P86L.

8.3.1 Utilización de compuestos bloqueantes de canales de Ca^{2+}

8.3.1.1 Co^{2+} : Desde hace décadas, se viene usando el Co^{2+} como bloqueante de numerosos procesos dependientes de Ca^{2+} ; el primero de ellos, fue la secreción de insulina por células pancreáticas (Henquin y Lambert, 1975). En nuestro laboratorio y con nuestras técnicas (es decir, medida de Ca^{2+} con ecurinas en células HeLa), en un principio, se intentaron replicar los

experimentos realizados por el equipo del Dr. Marambaud, en los que bloquearon el canal administrando un bloqueante inespecífico de canales de cationes, como es el Co^{2+} (Dreses- Werringloer y col., 2008). Tras utilizar preliminarmente MnSO_4 y ZnCl_2 , se eligió el Co^{2+} (CoCl_2) como bloqueante de CALHM1, por la reproducibilidad de su capacidad bloqueante. La perfusión de Co^{2+} (100 μM) 2 minutos antes y durante la reintroducción de Ca^{2+} fue capaz de inhibir un 65 % la señal de Ca^{2+} citosólica mediada por la forma nativa del canal (pico máximo de la amplitud (65,33 %, Fig. 51c) y ABC (67,02 %, Fig. 51d)), mientras que abolió prácticamente en su totalidad (99,25 %, Fig. 51c) la señal citosólica de Ca^{2+} inducida por P86L-CALHM1.

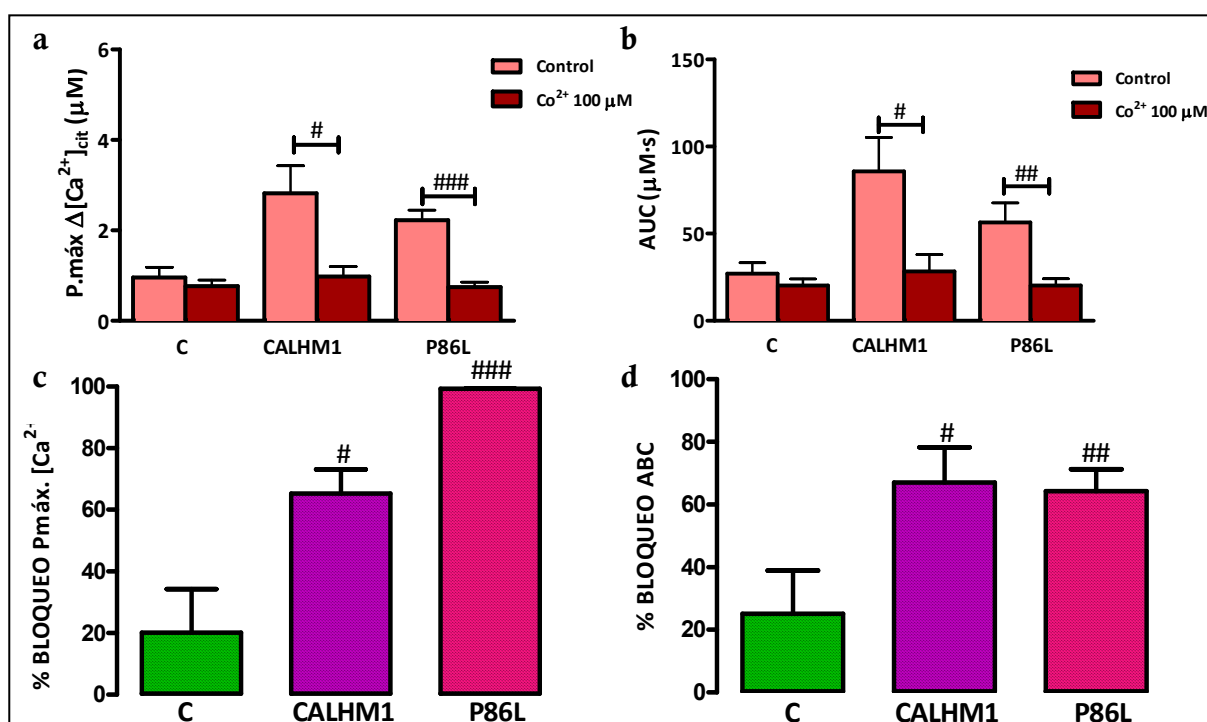


Fig. 51.- El Co^{2+} bloquea eficazmente al canal CALHM1/P86L-CALHM1.

a) Pico máximo de la elevación del Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) y b) Área bajo la curva (ABC) tras una reintroducción de Ca^{2+} en presencia o no de 100 μM de Co^{2+} , en células HeLa co-transfectadas con la ecurina citosólica y el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L); c) Porcentaje del bloqueo del pico máximo y d), de la ABC.

Datos obtenidos de 9 experimentos procedentes de 3 cultivos distintos. Comparación entre medias realizada con t-Student, siendo # = $p < 0,05$; ## = $p < 0,01$ y ### = $p < 0,001$.

8.3.1.2 **Fluconazol**: Posteriormente, se pretendió bloquear la señal de CALHM1/P86L-CALHM1 mediante la modulación de la entrada capacitativa de Ca^{2+} con el imidazol antimicótico fluconazol (Fig. 52a; Villalobos y col., 1992), con la idea de que CALHM1 podría guardar

alguna relación con dicho mecanismo, pues, al igual que ocurre con las proteínas implicadas en la entrada capacitativa de Ca^{2+} (STIM1 y ORA1), CALHM1 se localiza en el RE y en la membrana plasmática, es activado por protocolos de reintroducción de Ca^{2+} e induce una entrada de Ca^{2+} . Para ello, se co-transfectaron las células con el canal y con la ecurina citosólica; el fluconazol (10 μM) fue administrado 2 minutos antes y durante la reintroducción de Ca^{2+} .

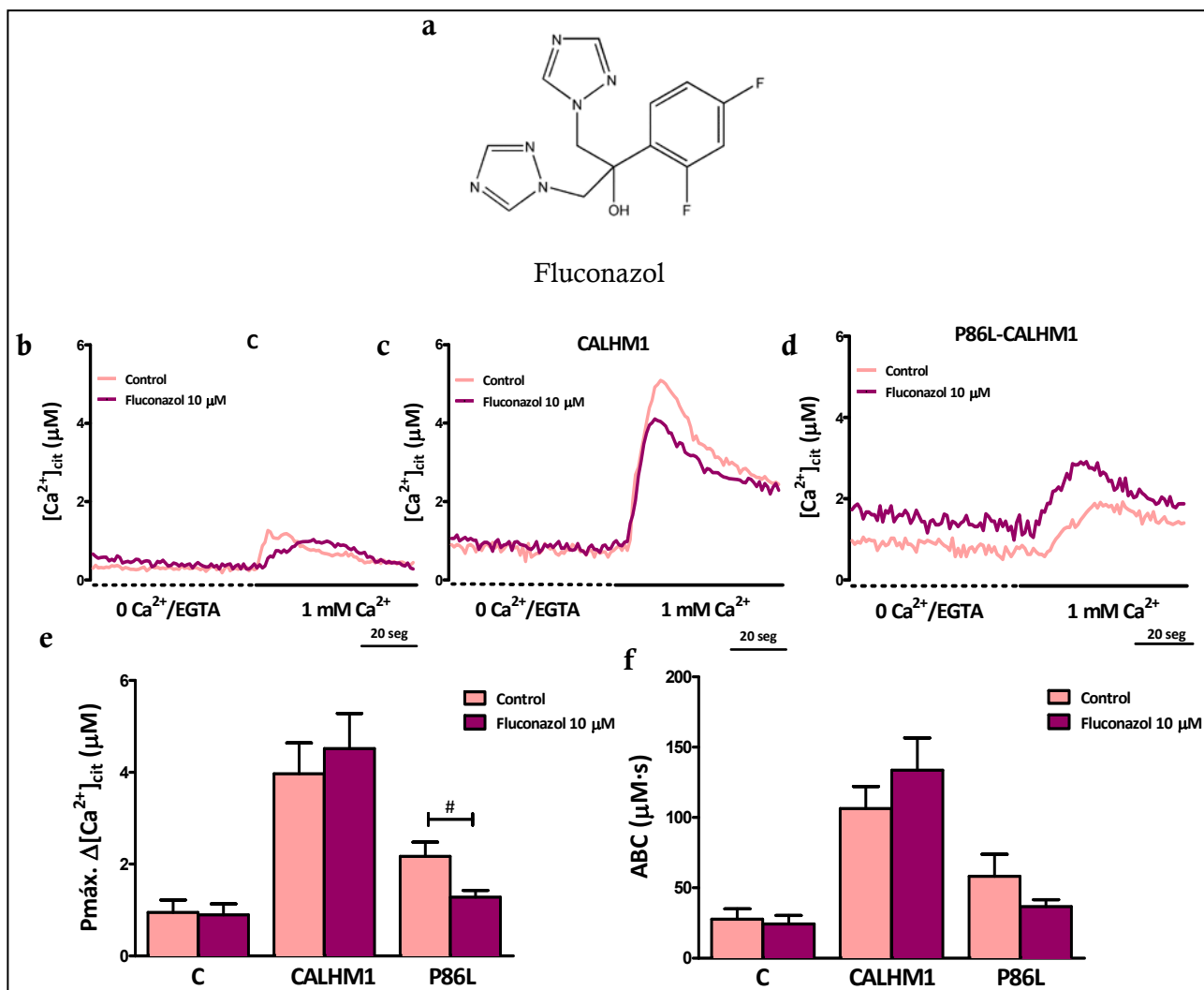


Fig. 52.- El fluconazol solo modula ligeramente a P86L-CALHM1.

a) Fórmula molecular del fluconazol; b), c) y d) Respectivamente, registros típicos de Ca^{2+} citosólico en células HeLa transfectadas con el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 sometidas a una reintroducción de Ca^{2+} en presencia de Fluconazol 10 μM o no (Control); e) Pico máximo de la elevación de la concentración de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) y f) Área bajo la curva (ABC).

Datos obtenidos de 6 experimentos procedentes de 2 cultivos distintos. Medias comparadas con t-Student, siendo # = $p < 0,05$.

Tal y como se aprecia en la Fig. 52b, el fluconazol no moduló de manera significativa la señal citosólica inducida por CALHM1, aunque esta tendió a aumentar, tanto en el pico, pasando de $3,968 \pm 0,671 \mu\text{M}$ en las células sin tratar a $4,516 \pm 0,762 \mu\text{M}$ (en las células tratadas), como al ABC, desde $106,4 \pm 15,76 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ en las células sin el fármaco a $133,8 \pm 22,9 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ (en las células tratadas) (Figs. 52 c, e y f). Sin embargo, la forma mutada P86L sí se vio modulada ligeramente por el fluconazol, de manera que el pico máximo de la elevación de Ca^{2+} subsecuente a un protocolo de reintroducción de dicho catión se redujo un 31,59 % (Fig. 52e), aunque la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ total por unidad de tiempo no se vio estadísticamente afectado ($58,24 \pm 15,66 \mu\text{M} \cdot \text{s}$, en células sin tratar y $36,75 \pm 4,942 \mu\text{M} \cdot \text{s}$, en células tratadas con fluconazol).

8.3.1.3 **ITH12233/IQM9.21**: Finalmente, se empleó un compuesto que había demostrado neuroprotección ante diversas condiciones de toxicidad (Lorrio y col., 2013), a través del bloqueo de corrientes de Ca^{2+} (Maroto y col., 2011): el ITH12233/IQM9.21 (Fig. 53), referido de aquí en adelante como ITH33¹²⁶. El compuesto ITH33 fue sintetizado gracias a una colaboración con el grupo de Química Médica del CSIC y fue seleccionado, de entre otros compuestos, pues al realizar el perfil farmacológico, se obtuvo que *i)* era capaz de atravesar la BHE; *ii)* ofrecía neuroprotección en células SH-SY5Y frente a daño oxidativo, sobrecarga de Ca^{2+} y tratamientos con βA y ácido okadaico; *iii)* neuroprotegía a las rodajas de hipocampo sometidas a privación de oxígeno y glucosa y *iv)* era neuroprotector frente una inyección intrahipocampal de kainato en rata (Arce y col., 2009). Dado el interés de este nuevo compuesto, se realizó una curva dosis-respuesta utilizando como concentraciones 1, 3 y 10 μM .

Para estudiar el efecto del ITH33 sobre CALHM1/P86L-CALHM1, se utilizaron células HeLa co-transfectadas con el canal y con la ecurina citosólica y se administró el ITH33 en las distintas soluciones salinas (0 Ca^{2+} y 1 mM Ca^{2+}), 2 min antes y durante la reintroducción de Ca^{2+} .

¹²⁶ ITH33: ITH12233

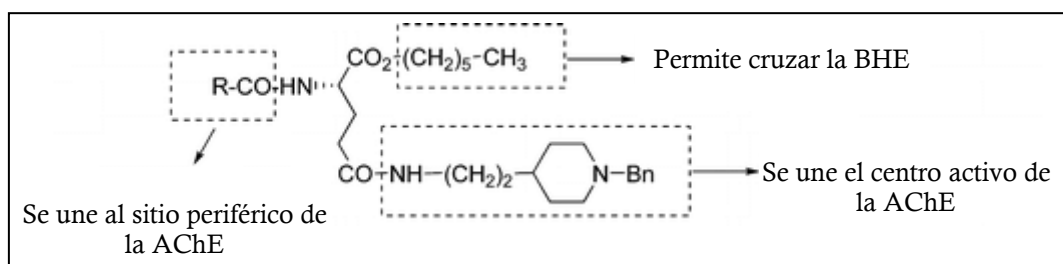


Fig. 53.- **Fórmula molecular del ITH12233.**
Se indican las funciones de los distintos radicales de la molécula

Tras analizar los parámetros cinéticos más importantes en el protocolo de reintroducción de Ca^{2+} , a saber, el pico máximo de elevación del Ca^{2+} citosólico y el Ca^{2+} acumulado por unidad de tiempo (o área bajo la curva) (Tabla 4), se advirtió que este compuesto no modulaba significativamente al canal CALHM1 ni a su polimorfismo P86L, aunque se apreció una clara tendencia a que el ITH33, a una concentración de 1 μM , bloqueara el pico máximo de Ca^{2+} mediado por CALHM1 (Fig. 54d).

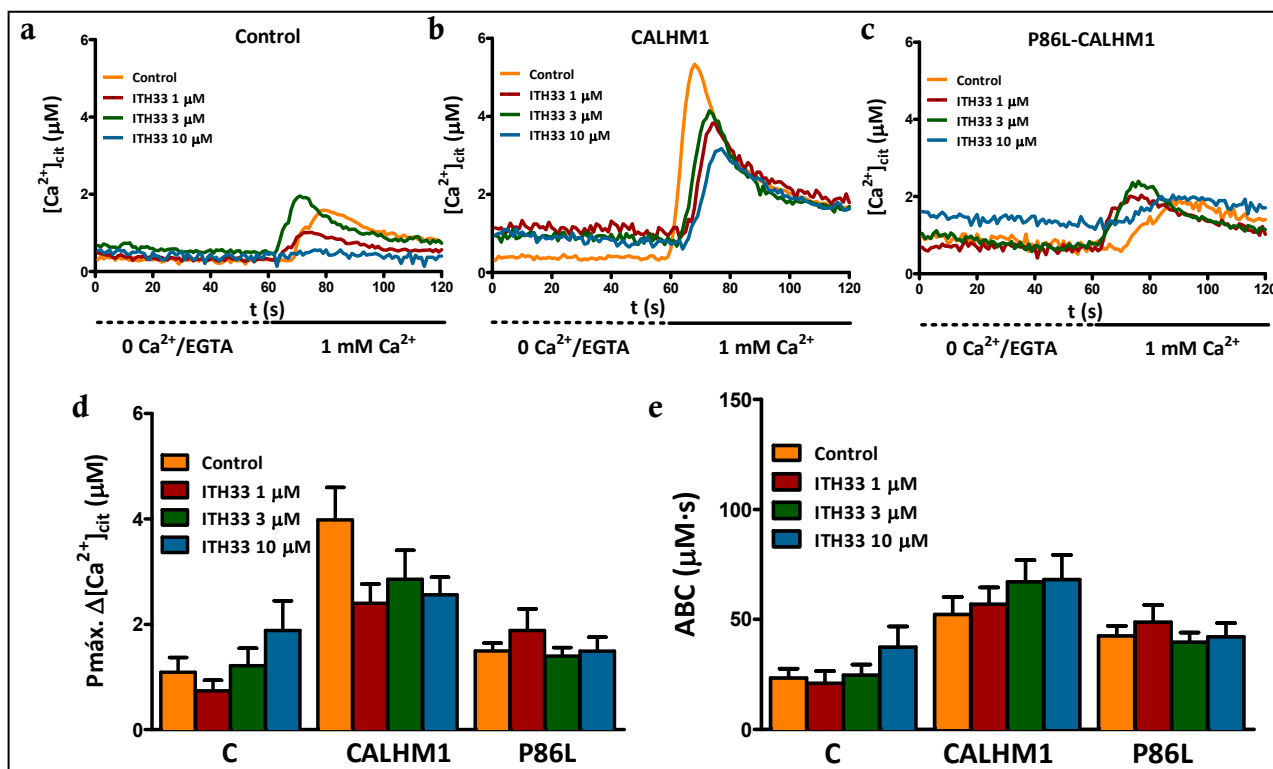


Fig. 54.- **El ITH12233 no modula a CALHM1/P86L-CALHM1.**

Registros típicos de Ca^{2+} citosólico en células HeLa transfectadas con el vector vacío (C, **a**), CALHM1 (**b**) o P86L-CALHM1 (**c**) sometidas a una reintroducción de Ca^{2+} en presencia o no de ITH12233 a 1, 3 ó 10 μM ; **d**) Pico máximo de la elevación de la concentración de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) y **e**) Área bajo la curva (ABC).

Datos obtenidos de 9 experimentos procedentes de 3 cultivos distintos. Comparación entre medias realizada con ANOVA y Bonferroni como post-análisis (no hay diferencias significativas).

Transfección	Tratamiento	Pmáx. $[Ca^{2+}]_{cit}$ (μM)	AUC ($\mu M \cdot s$)
C	Control	$1,088 \pm 0,281$	$23,35 \pm 4,185$
	ITH33 1 μM	$0,739 \pm 0,2$	$20,92 \pm 5,57$
	ITH33 3 μM	$1,217 \pm 0,328$	$24,65 \pm 4,773$
	ITH33 10 μM	$1,88 \pm 0,566$	$37,37 \pm 9,497$
CALHM1	Control	$3,983 \pm 0,618$	$52,32 \pm 7,834$
	ITH33 1 μM	$2,401 \pm 0,362$	$56,89 \pm 7,758$
	ITH33 3 μM	$2,857 \pm 0,549$	$67,19 \pm 9,847$
	ITH33 10 μM	$2,562 \pm 0,337$	$68,08 \pm 11,29$
P86L	Control	$1,4985 \pm 0,148$	$52,32 \pm 7,834$
	ITH33 1 μM	$1,88 \pm 0,415$	$56,89 \pm 7,758$
	ITH33 3 μM	$1,397 \pm 0,161$	$67,19 \pm 9,847$
	ITH33 10 μM	$1,49 \pm 0,264$	$68,08 \pm 11,29$

Tabla 4.- **Modulación del por ITH12233 (ITH33) sobre la señal de Ca^{2+} citosólico mediada por el protocolo de reintroducción de Ca^{2+} .**

Las células HeLa co-transfectadas con la ecuorina citosólica y el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L), fueron sometidas a un protocolo de reintroducción de Ca^{2+} en presencia de ITH33 a 1, 3 y 10 μM .

Datos obtenidos de 9 experimentos para cada variable procedentes de 3 cultivos distintos. ANOVA y Bonferroni como post-análisis; no se apreciaron diferencias significativas.

8.3.2 Utilización de fármacos moduladores de la homeostasia de Ca^{2+} mitocondrial

8.3.2.1 **Dimebona**: Posteriormente, se seleccionó un fármaco multidiana, neuroprotector frente a diversos estímulos tóxicos, usado tradicionalmente en Rusia como antihistamínico y con un cierto efecto beneficioso para los enfermos de Alzheimer: la latrepidina, también llamada dimebolina o dimebona (Fig. 55a; Bachurin y col., 2001). En 2003, se publicó un artículo en el que se infería que la dimebona protegía a las mitocondrias frente al βA , mediante la realización de un burdo experimento de densitometría óptica de la masa mitocondrial (Bachurin y col., 2003). Aunque estudios clínicos posteriores (Cano-Cuenca y col., 2014) han denostado los beneficios cognitivos que el tratamiento con dimebona podría tener (Doody y col., 2008), este compuesto continúa ciertamente en boga debido a sus diversas propiedades biológicas (Bharadwaj y col., 2013).

Antes de analizar la modulación de CALHM1/P86L-CALHM1 realicé un elegante experimento para demostrar uno de los mecanismos de acción más importantes de la dimebona: mediante la técnica de la calceína- Co^{2+} (Fig.

55b), se pudo determinar si este fármaco modulaba la apertura del poro de permeabilidad transitoria (mPTP) y, por ende, el inicio de la apoptosis. La perfusión continua de péptido βA_{25-35} a $25 \mu M$ indujo una clara apertura del mPTP (Fig. 55c), que fue revertida completamente con $5 \mu M$ de dimebona (Fig. 55d).

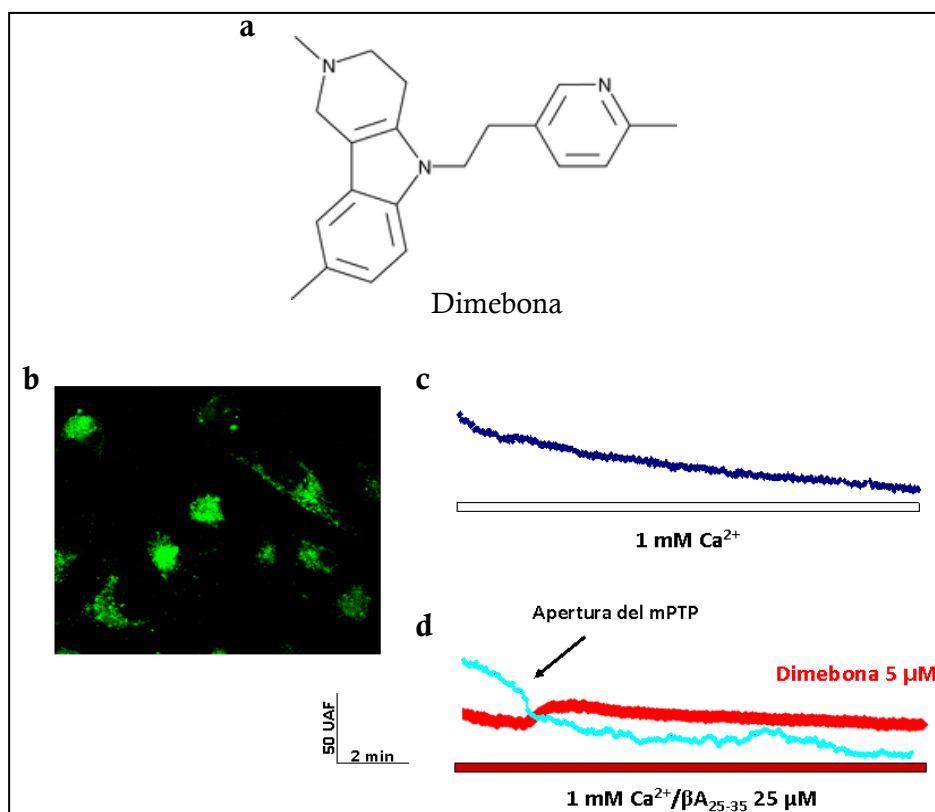


Fig. 55.- La dimebona bloquea la apertura del poro de permeabilidad transitoria.
a) Fórmula molecular la dimebona; b) Imagen de las mitocondrias teñidas con la técnica calceína- Co^{2+} ; c) Registro típico de calceína- Co^{2+} en el que se aprecia el quemado de la sonda a lo largo del tiempo; d) Trazas de registros de calceína- Co^{2+} en células tratadas con péptido β -amiloide₂₅₋₃₅ ($25 \mu M$) en las que se aprecia una inflexión debida a la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP). Cuando se co-administra dimebona ($5 \mu M$), este efecto se revierte.

Una vez realizada esta comprobación, se trató de modular al canal con dimebona, esta vez, y tras varias tentativas, utilizando una concentración más elevada que lo común ($20 \mu M$). En células HeLa co-transfectadas con el canal y con la ecurina citosólica, se realizó el protocolo de reintroducción de Ca^{2+} en condiciones control (sin el fármaco) o en presencia, diluida en las soluciones salinas que perfunden las células Dimebona $20 \mu M$.

Tal y como se aprecia en la Fig. 56, ni CALHM1 ni P86L-CALHM1 fueron modulados por la dimebona, dado que en ninguno de los parámetros cinéticos analizados se observaron diferencias significativas; sin embargo, se aprecian ciertas tendencias hacia el bloqueo, especialmente de la forma nativa del canal. Así, las células control produjeron una señal de Ca^{2+} con un pico máximo de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ de $0,958 \pm 0,227 \mu\text{M}$ y una ABC de $27,04 \pm 6,309 \mu\text{M} \cdot \text{s}$, mientras que con dimebona el pico máximo fue de $0,961 \pm 0,153 \mu\text{M}$ y la ABC, $23,30 \pm 5,089 \mu\text{M} \cdot \text{s}$. Las células que expresaban CALHM1 incrementaron el Ca^{2+} hasta $5,671 \pm 0,600 \mu\text{M}$ (pico máximo) y $148,2 \pm 19,98 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ (ABC) y las tratadas con dimebona, hasta $4,344 \pm 0,738 \mu\text{M}$ (pico máximo) y $126,6 \pm 2129 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ (ABC). Por su parte, las células transfectadas con el polimorfismo P86L, tuvieron un pico máximo de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ de $2,765 \pm 0,291 \mu\text{M}$ y en presencia de dimebona $2,195 \pm 0,266 \mu\text{M}$ y un ABC de $82,78 \pm 9,651 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ y con el tratamiento de dimebona $68,77 \pm 10,89 \mu\text{M} \cdot \text{s}$.

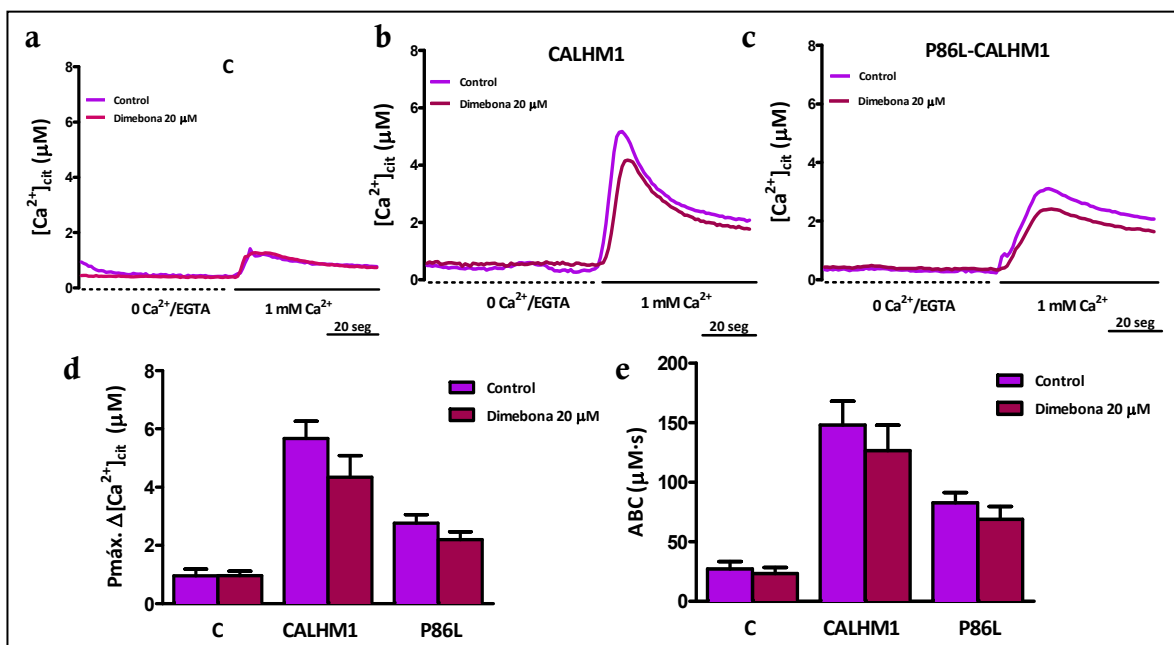


Fig. 56.- Efecto de la dimebona sobre la señal de Ca^{2+} mediada por CALHM1.

Registros típicos de una reintroducción de Ca^{2+} mientras se monitoriza el Ca^{2+} mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$) en células HeLa transfectadas con el vector vacío (C, a), CALHM1 (b) o P86L-CALHM1 (c) en presencia o no de dimebona a 20 μM; d) Pico máximo de la elevación de la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ y e) Área bajo la curva (ABC). Datos obtenidos de 9 experimentos procedentes de 3 cultivos distintos, comparándose las medias con t-Student (no hay diferencias significativas).

Aunque no mostrado, durante los registros de Ca^{2+} mitocondrial y al finalizar el protocolo de reintroducción de Ca^{2+} se administraba un pulso de histamina (100 μM , 15 s) para comprobar la viabilidad de las células; en presencia de dimebona, fue inefectivo, debido a las propiedades antihistaminérgicas del compuesto.

8.3.2.2 **CGP37157**: El siguiente compuesto a estudiar fue el bloqueante del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial, CGP37157 (Fig. 57a; Hernández-SanMiguel y col., 2006). Se trata de un fármaco neuroprotector frente a diversos estímulos tóxicos, tales como la sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} con veratridina, excitotoxicidad por glutamato o privación de oxígeno y glucosa, debido a que además de modular la homeostasia del Ca^{2+} mitocondrial, es capaz de bloquear inespecíficamente diversos canales de Ca^{2+} y Na^+ (Nicolau y col., 2009, Nicolau y col., 2010; González-Lafuente y col., 2012, Ruiz y col., 2014). Dado este doble papel del CGP37157, se postuló si podría modular de alguna forma la señal de Ca^{2+} mediada por CALHM1/P86L-CALHM1.

Se realizó el típico protocolo de reintroducción de Ca^{2+} en presencia de concentraciones crecientes de CGP37157, a saber, 1, 3, 10 y 30 μM (Fig. 57b, c y d).

Como resultado de esta curva dosis-respuesta, se obtuvo que el CGP37157 a la menor concentración ensayada (1 μM) bloqueó de manera selectiva (con respecto a su forma mutada) a la forma nativa del canal CALHM1, pues redujo el pico máximo de la entrada de Ca^{2+} un 39 % (Fig. 57g) y el contenido total de Ca^{2+} por unidad de tiempo en un 35 % (Fig. 57h). Sin embargo, el CGP37157 no siguió el patrón típico de concentración-dependencia de numerosos bloqueantes, ya que su efecto modulador se perdía a 3 μM . No obstante, a 10 μM y 30 μM sí fue capaz de bloquear el pico máximo de CALHM1 un 29 % y un 42 %, respectivamente. Curiosamente, el CGP37157 no solo no tuvo ninguna propiedad moduladora de la forma mutada P86L-CALHM1, sino que a 10 y 30 μM evocó un incremento tanto del Ca^{2+} total como del pico máximo, respectivamente (Figs. 57f y g).

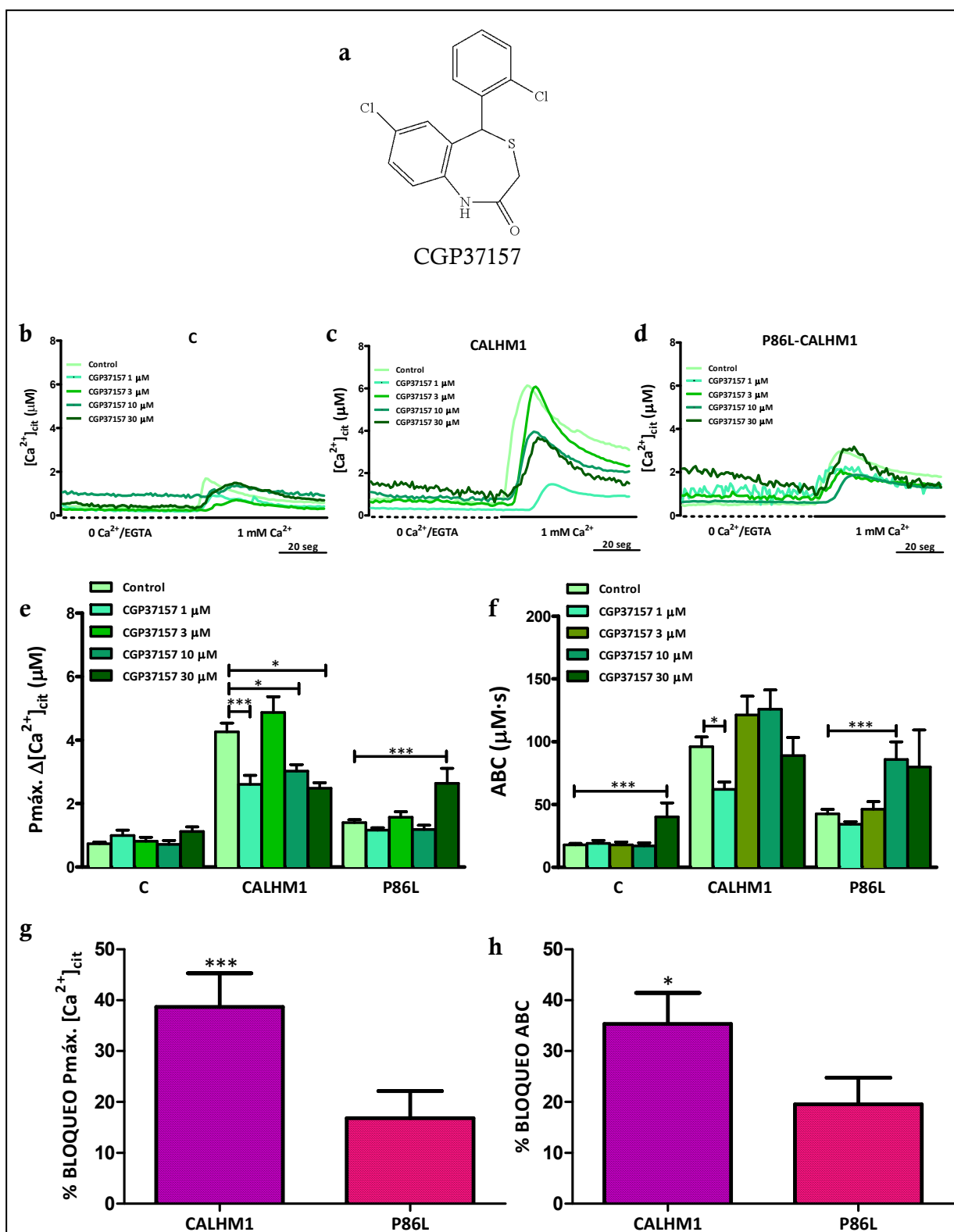


Fig. 57.- El CGP37157 bloquea selectivamente CALHM1.

Registros típicos de Ca^{2+} citosólico en células HeLa transfectadas con el vector vacío (C, a), CALHM1 (b) o P86L-CALHM1 (P86L, c) sometidas a una reintroducción de Ca^{2+} en presencia o no de CGP37157 a 1, 3, 10 y 30 μM; d) Pico máximo de la elevación de la concentración de Ca^{2+} citosólico ($[Ca^{2+}]_{cit}$) y b) Área bajo la curva (ABC); f) Porcentaje de bloqueo del pico máximo; g) Porcentaje de bloqueo de la ABC.

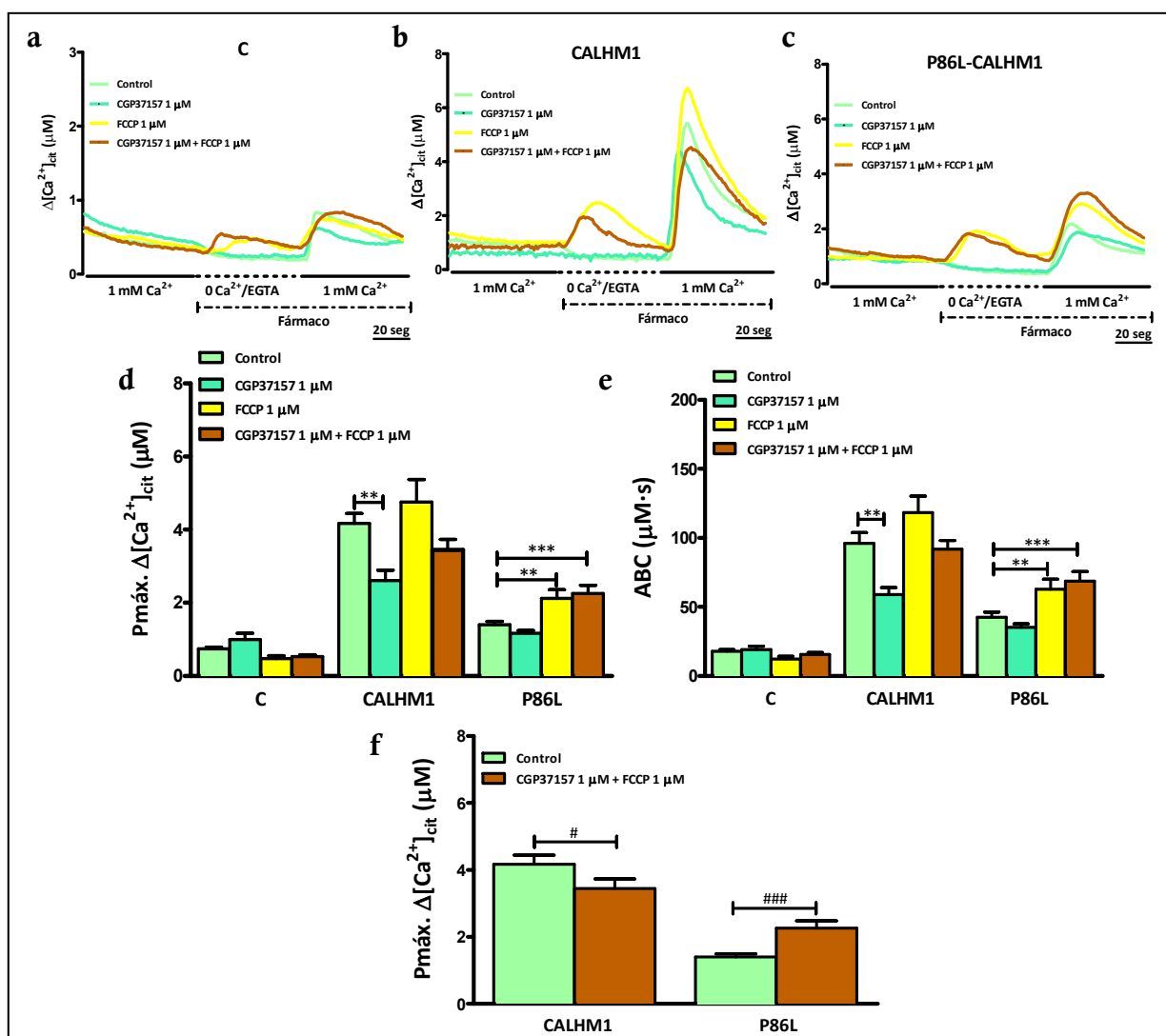
Datos obtenidos de al menos 9 experimentos procedentes de 3 cultivos distintos.

Comparación entre medias realizada con ANOVA y Bonferroni como post-análisis, siendo * = p < 0,05 y *** = p < 0,001.

No obstante, conviene recordar que al bloquear el mNCX, se termina abolviendo el gradiente electroquímico que facilita la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, de manera que se anula la capacidad tamponadora de Ca^{2+} de esta, incrementándose así el Ca^{2+} citosólico. Cabe la posibilidad, pues, de que el bloqueo de CALHM1 mediado por el CGP37157 sea un efecto secundario a la modulación del mNCX, dado que los canales de Ca^{2+} se inactivan en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} citosólico (véase como ejemplo Budde y col., 2002). Para descartar esta posibilidad, eliminamos la diana mitocondrial del CGP37157, mediante el empleo de un protonóforo como el FCCP, que se inserta en las membranas mitocondriales, desacoplando el potencial de membrana mitocondrial (Ψ_{mit}^{127}) y depletando, finalmente, a las células de ATP.

Según se aprecia en la Fig. 58, la perfusión de FCCP (1 μM , 2 min antes y durante el protocolo de reintroducción de Ca^{2+}) "per se" genera un incremento de Ca^{2+} en el citosol que tiende a aclararse en el tiempo. En estos experimentos de reintroducción de Ca^{2+} , el CGP37157 a 1 μM bloqueó a CALHM1 un 37,44 %, observando el pico máximo, siendo un dato muy similar a lo observado anteriormente (Fig. 57); sin embargo, en presencia de FCCP, este bloqueo fue menor (solo del 17,38 %, siendo el pico máximo de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ $4,172 \pm 0,274 \mu\text{M}$ en células sin tratar y $3,447 \pm 0,282 \mu\text{M}$ en las células tratadas), debido al efecto recién comentado que el FCCP tiene "per se" sobre el Ca^{2+} (Fig. 58d). Aun así, se puede advertir que la combinación CGP37157 μM y FCCP μM es capaz de bloquear CALHM1, mientras que incrementa muy significativamente la señal de Ca^{2+} en el caso de que la mutación P86L se halle presente (Fig. 58d y f). Con respecto al Ca^{2+} total por unidad de tiempo, se obtienen resultados similares a lo referenciado con el pico máximo de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, pues las células control que expresaban CALHM1 tenían una ABC de $96,03 \pm 7,831 \mu\text{M} \cdot \text{s}$; en presencia de CGP37157 μM , esta se reduce a $58,91 \pm 5,169 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ (un 38,65 %), mientras que cuando CGP37157 μM está combinado con FCCP μM , los niveles ascienden a $91,75 \pm 6,266 \mu\text{M} \cdot \text{s}$, perdiéndose así la significación (Fig. 58e).

¹²⁷ Ψ_{mit} : Potencial de membrana mitocondrial



Posteriormente, se comprobó si este fármaco podría ser citotóxico para las células. Para ello, se transfectaron células HeLa con 0,75 μg del ADNc del vector vacío (C) o los que codificaban para CALHM1 o P86L-CALHM1. Pasadas 24 h, durante los cuales los ADNc se expresan, se trataron durante 24 h con CGP3757 10 μM . Según se aprecia en la Fig. 59, el tratamiento con CGP37157 10 μM no indujo cambios morfológicos en las células control o en las que expresaban CALHM1 o P86L-CALHM1.

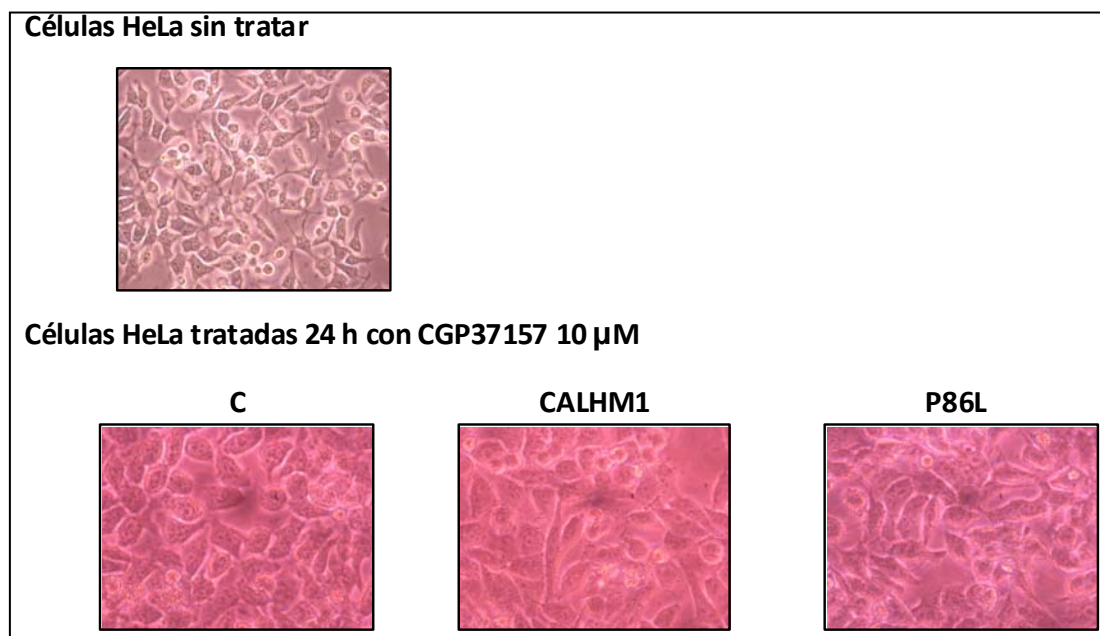


Fig. 59.- **El CGP37157 no indujo cambios morfológicos en las células.** Imágenes tomadas (x 200) de células HeLa sin transfectar y sin tratar, o bien transfectadas con el vector vacío (C), CALHM1 y P86L-CALHM1 (P86L) y tratadas durante 24 h con CGP37157 a una concentración de 10 μ M.

8.3.2.3 **ITH12575**: Finalmente, se decidió utilizar un derivado isopropílico del CGP37157, sintetizado por el Dr. Cristóbal de los Ríos. En experimentos realizados en el laboratorio de la Dra. María Cano por D. Francisco J. Martínez-Sanz, había demostrado ser mucho más afín al mNCX, siendo su DE_{50}^{128} 0,69 μ M, mucho menor que el cabeza de serie CGP37157, cuya DE_{50} es de 1,6 μ M. No obstante, según experimentos realizados por el Dr. Jose Carlos Fernández Morales, el ITH12575 no bloqueaba los CCDV tan eficazmente como el CGP37157, por lo que no sólo es más afín, sino que también presenta una mayor selectividad para el mNCX. El compuesto ITH12575 tuvo un perfil protector similar que el cabeza de serie, aunque el enantiómero AT2, o (+)-ITH12575 (conformación S) resultó proteger más frente al daño inducido por excitotoxicidad por glutamato (1 mM) en rodajas de hipocampo de rata (datos procedentes del laboratorio del Dr. Cristóbal de los Ríos).

Para analizar la capacidad bloqueante del ITH12575 sobre CALHM1/P86L-CALHM1, se utilizaron células HeLa que sobre-

¹²⁸ DE_{50} : Dosis efectiva 50

expresaban la ecurina citosólica y cada canal, o el vector vacío, a las que se realizó un protocolo de reintroducción de Ca^{2+} para activar el canal. Los fármacos de estudio (el racémico ITH12575 y cada uno de sus enantiómeros, el AT1, o (-)-ITH12575 (conformación R) y el AT2, o (+)-ITH12575 (conformación S) (Fig. 60a)) se perfundieron 2 minutos antes y durante el protocolo de reintroducción de Ca^{2+} . Para comparar si estos compuestos eran más potentes que el cabeza de serie, se utilizó como concentración aquélla para la que el CGP37157 mostró más capacidad de bloqueo de CALHM1, a saber 1 μM .

Tras el análisis de los parámetros cinéticos pertinentes, se pudo deducir que el ITH1575 moduló con una menor potencia a CALHM1 que el CGP37157. Así, el racémico redujo parcialmente el área bajo la curva de la forma nativa del canal, pasando ésta de $81,65 \pm 11,65 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ en las células sin tratar a $52,36 \pm 10,32 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ (Fig. 60f). El enantiómero más potente fue el AT2 ((+)-ITH12575 (conformación S)), pues bloqueó la señal de Ca^{2+} citosólica inducida por CALHM1 casi en un 50 %, tanto el pico máximo (siendo de $3,498 \pm 0,556 \mu\text{M}$ en las células con tratar a $1,854 \pm 0,488 \mu\text{M}$ en las células tratadas con AT2) (Fig. 60e), como el ABC (reduciéndose a $26,43 \pm 3,411 \mu\text{M} \cdot \text{s}$) (Fig. 60f); pese a estos sugerentes datos, la dispersión de los mismos limitó la significancia de las diferencias. Una vez más, el polimorfismo P86L se mantuvo completamente inalterado (tanto en pico máximo de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (Fig. 60e), como en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ total (Fig.60f)) ante la presencia ITH12575 o de cualquiera de sus dos fármacos, indicando que esta familia de compuestos muestra selectividad hacia la forma nativa de CALHM1, lo cual es "per se" un gran hallazgo.

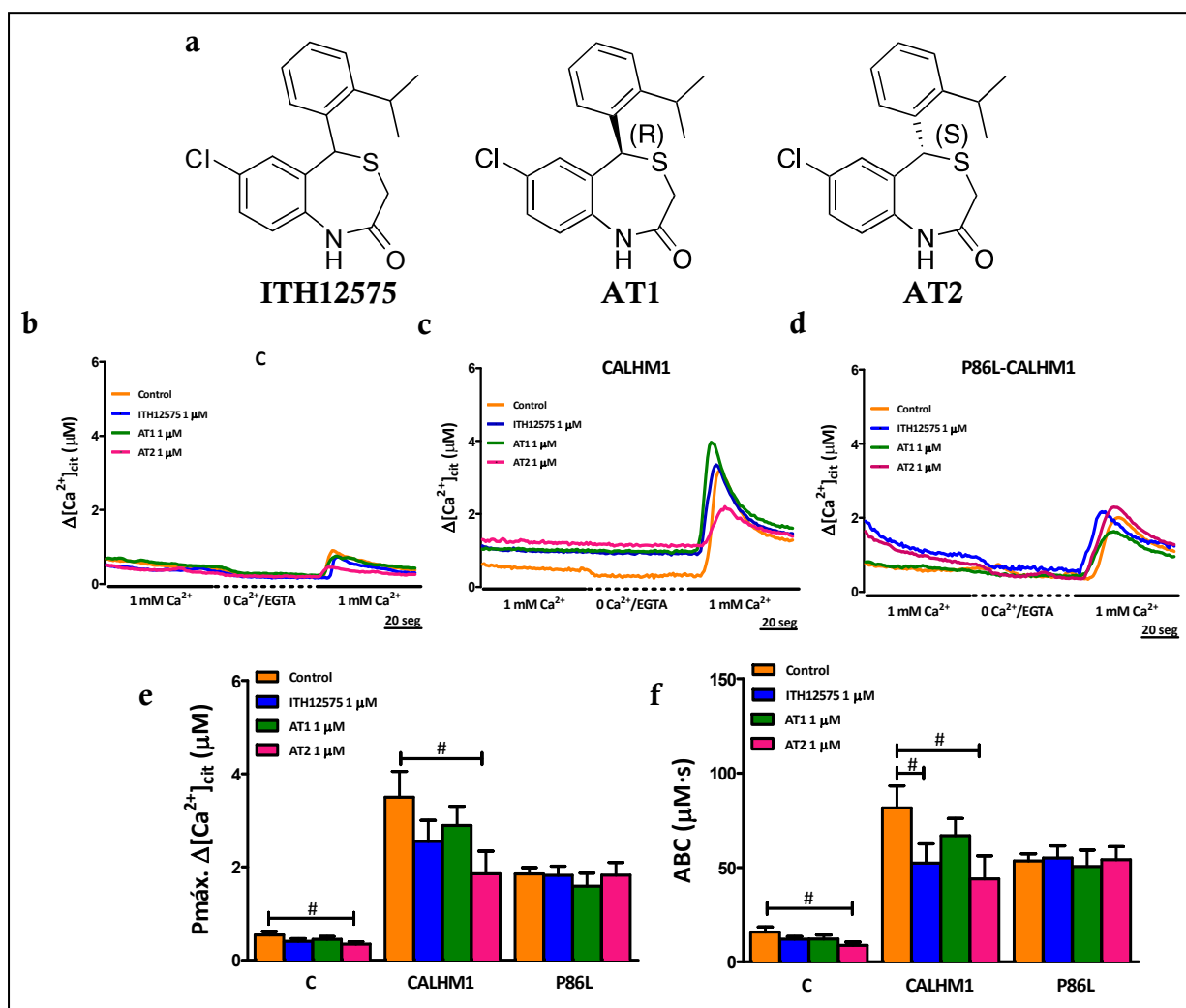


Fig. 60.- El ITH12575 bloquea ligeramente CALHM1.

a) Fórmulas moleculares del ITH12575 y de sus enantiómeros R, AT1 y S, AT2; Registros típicos de Ca^{2+} citosólico ($[Ca^{2+}]_{cit}$) en células HeLa transfectadas con el vector vacío (C, b), CALHM1 (c) o P86L-CALHM1 (P86L), d) realizando una reintroducción de Ca^{2+} con ITH12575, o AT1 o AT2 a 1 μ M; d) Pico máximo de la elevación de $[Ca^{2+}]_{cit}$; d) Área bajo la curva (ABC) del incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$.

Datos obtenidos de 12 experimentos procedentes de 4 cultivos distintos. Comparación entre medias realizada con ANOVA y Bonferroni como post-análisis, sin obtener diferencias significativas, o con estadístico t-Student, siendo $\# = p < 0,05$.

8.3.3 Efecto del péptido β A sobre la señal de Ca^{2+} mediada a través de CALHM1

Habida cuenta de que CALHM1/P86L-CALHM1 están implicados en el metabolismo del péptido β A mediante un proceso dependiente de Ca^{2+} , fue de interés estudiar si este péptido alteraba la homeostasia del Ca^{2+} en presencia de ambas formas del canal.

Se ha descrito en numerosas ocasiones que los oligómeros del βA_{1-42} conforman poros en la membrana plasmática a través de los cuales se pueden detectar corrientes de Ca^{2+} , lo cual acaba incrementando la $[Ca^{2+}]_{cit}$ (Sanz-Blasco y col., 2008; Sepúlveda y col., 2010). Sin embargo, hasta el momento muy pocos autores han determinado de manera directa si la homeostasia de Ca^{2+} mitocondrial puede ser alterada subsecuentemente a este Ca^{2+} (escasos ejemplos son Sanz-Blasco y col., 2008 o Villalobos y col., 2012), por lo que resultó de interés profundizar en este mecanismo inducido por el βA_{1-42} . En un primer momento, mediante el uso de una sonda fluorescente sensible a Ca^{2+} dirigida genéticamente a la matriz mitocondrial, a saber, el Pericam mitocondrial, se pudo determinar que la perfusión continua de oligómeros solubles de βA_{1-42} (5 μM) indujo ligeras oscilaciones de Ca^{2+} mitocondrial (Fig. 61a) en el 68,39 % de las 119 células analizadas, que aparecieron a partir de los 2 min de la administración del péptido y que tendieron a desaparecer (aunque no siempre) varios minutos después de eliminar el tratamiento. Dado que el βA_{1-42} se inserta en las membranas mitocondriales a través de la translocasa TOM (Hansson-Petersen y col., 2008), nos preguntamos si estos transientes de Ca^{2+} podrían ser debidos a la formación de poros en estas membranas o bien podrían ser un reflejo de variaciones en el Ca^{2+} citosólico; para ello, se eliminó la membrana extracelular permeabilizando las células y registrando $[Ca^{2+}]_{mit}$ en mitocondrias "in situ". Como aparece en la Fig. 61b, los transientes de Ca^{2+} mitocondrial originados por el péptido βA_{1-42} (5 μM) fueron completamente dependientes de la membrana plasmática, pues al eliminarla se abolen las señales de Ca^{2+} mitocondrial, lo que indica que los posibles poros de este péptido no son funcionales en las membranas mitocondriales.

Finalmente, dado que las señales de Ca^{2+} pueden conllevar a variaciones en el pH, fue de interés demostrar mediante una sonda dirigida genéticamente a la mitocondria sensible al pH como es mtAlpHi, que, en efecto, el 55,5 % de 42 células mostraban un incremento en el pH

mitocondrial de $0,07 \pm 0,03$ Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (UAF¹²⁹), ante la perfusión continuada de βA_{1-42} (5 μM) (Fig. 62).

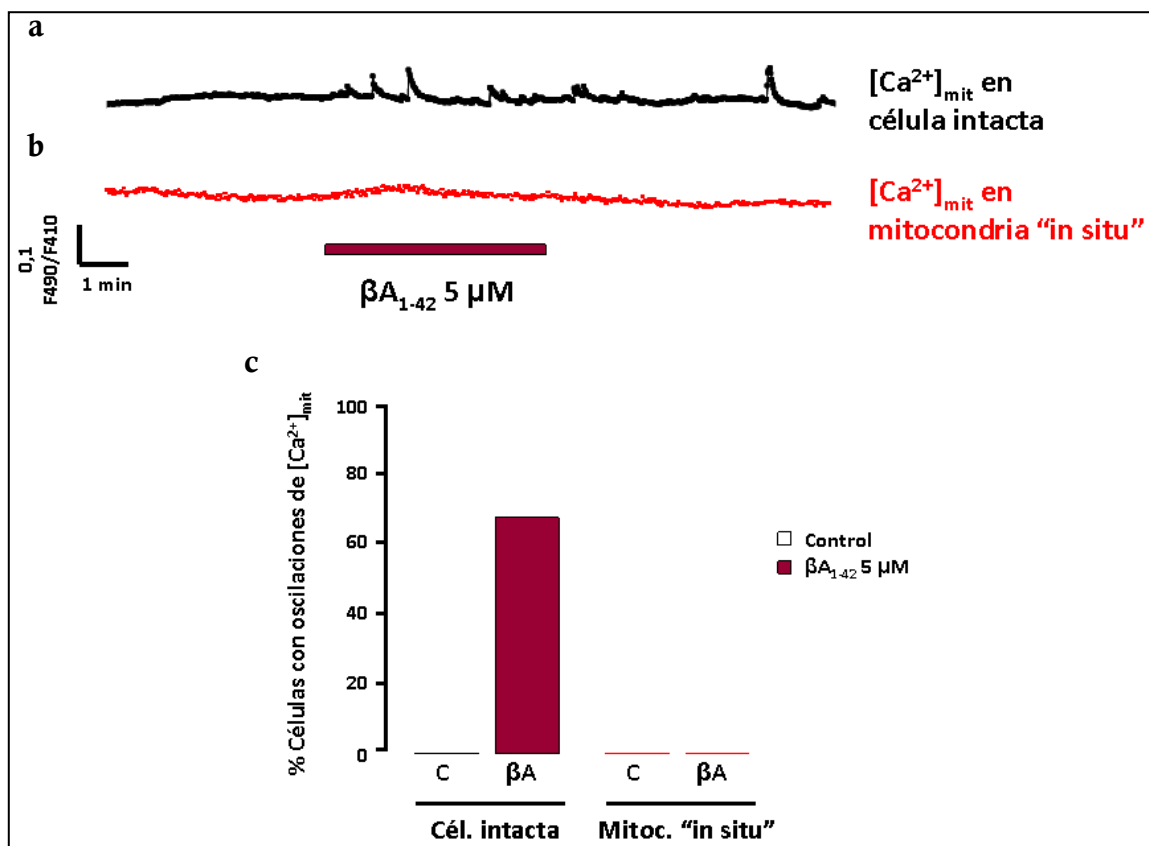


Fig. 61.- El péptido β -amiloide₁₋₄₂ induce oscilaciones de Ca^{2+} mitocondrial.

a) Registro típico de Ca^{2+} mitocondrial ($[Ca^{2+}]_{mit}$) obtenido con la sonda fluorescente Pericam. El péptido β -amiloide₁₋₄₂ (βA) induce oscilaciones de $[Ca^{2+}]_{mit}$; b) Registro de $[Ca^{2+}]_{mit}$ en células permeabilizadas, en las que se abolen los transientes de Ca^{2+} ; c) Cuantificación de las células que responden con oscilaciones de Ca^{2+} mitocondrial.

Datos obtenidos de 119 células de 4 cultivos (en células intactas) y 29 células de 2 cultivos (células permeabilizadas).

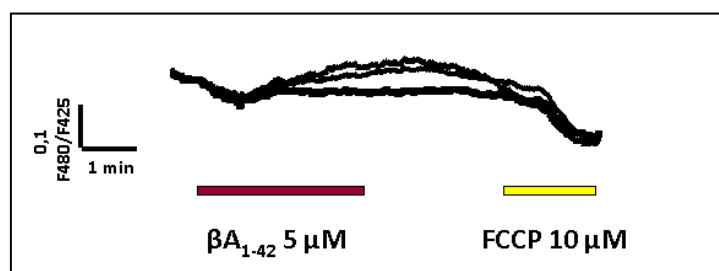


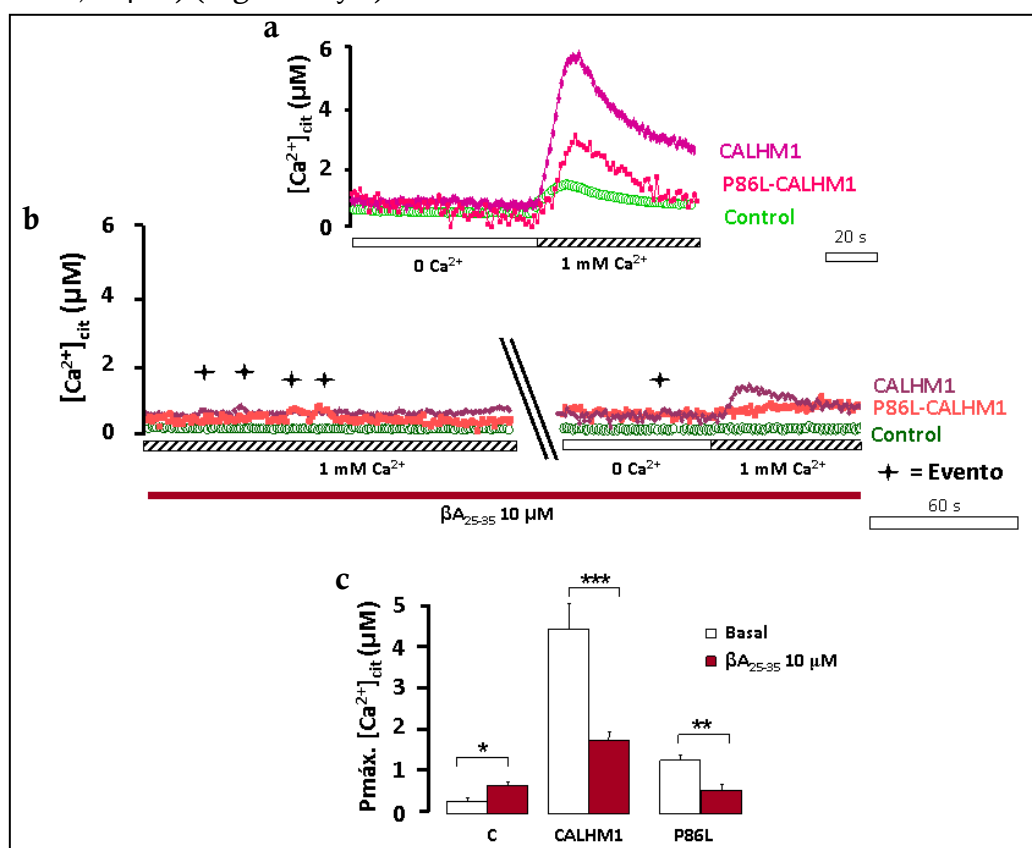
Fig. 62.- El péptido β -amiloide₁₋₄₂ incrementa el pH mitocondrial.

Trazas típicas obtenidas de pH mitocondrial obtenidas con la sonda fluorescente mtAlpHi. Para controlar la sensibilidad de la sonda al pH, se finalizaban los experimentos con la perfusión del protonóforo FCCP.

42 células estudiadas procedentes de 3 cultivos distintos.

¹²⁹ UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia

Teniendo en mente que el βA altera la homeostasia de Ca^{2+} mitocondrial y, por ende, el pH de esta organela, mediante un mecanismo secundario a su intervención en la membrana plasmática, se procedió a estudiar si ejercía algún papel en las señales citosólicas inducidas por CALHM1/P86L-CALHM1. Para comenzar, las células transfectadas con el vector vacío, CALHM1 o P86L-CALHM1 se perfundieron con 10 μM de péptido βA_{25-35} y tras unos 5 min de tratamiento, únicamente en las células en las que el canal se hallaba expresado comenzaron a aparecer unos transientes de Ca^{2+} citosólicos, denominados en la Fig. 63b como "Eventos". Posteriormente, se realizó el típico protocolo de reintroducción de Ca^{2+} bajo la exposición de dicho péptido βA_{25-35} (10 μM) y se advirtió que, comparado con el protocolo de las células son tratar (Fig. 63a), el pico máximo de $[Ca^{2+}]_{cit}$ se redujo un 40,32 % en las células CALHM1 (de 4,34 μM a 1,75 μM) y un 44 % en las células que expresaban el polimorfismo P86L (de 1,25 μM a 0,55 μM) (Figs. 63b y c).



Por tanto, queda demostrado que CALHM1/P86L-CALHM1 inducen unas señales de Ca^{2+} a distintos niveles subcelulares y modulables por el péptido βA . El siguiente paso a dilucidar es si este tándem CALHM1/P86L-CALHM1- Ca^{2+} - βA juega un papel conjunto en la neurodegeneración.

8.4 Estudio de la vulnerabilidad celular ante diversos estímulos tóxicos inducida por P86L-CALHM1

Para comenzar con el estudio de la vulnerabilidad inducida por el canal, se realizaron una serie de ensayos de viabilidad mediante MTT.

9.4.1 Efectos de P86L-CALHM1 sobre la viabilidad celular ante diversos tóxicos, estudiados mediante MTT

La primera tentativa se llevó a cabo en células HeLa transfectadas durante 3,5 h con 0,5 μg del ADNc del vector vacío, de CALHM1 o de P86L-CALHM1. 24 h después de la transfección, las células fueron sometidas durante 13,5 h a un tratamiento de 5 μM de oligómeros solubles de βA_{1-42} o bien 0,5 μM de estaurosporina (como control positivo de muerte). Como era de esperar, en las 3 muestras experimentales, la estaurosporina redujo la viabilidad en torno a un 50 %. Por su parte, el tratamiento con el βA_{1-42} disminuyó la viabilidad un 26,95 % en las células control, un 28,99 % en las células transfectadas con CALHM1 y un 25,96 % en las células que expresaban P86L-CALHM1, sin advertirse diferencias significativas entre las distintas células (Fig. 64).

Posteriormente, se cambió el tiempo de incubación de la transfección, utilizándose el protocolo empleado en el resto de experimentos de la presente Memoria (dícese, 5 h; 0,5 μg del ADNc del vector vacío, de CALHM1 o de P86L-CALHM1) y se exploró la toxicidad de distintas moléculas. Para comenzar, se analizó si la mera expresión del canal era tóxica para las células; para ello, se transfectaron las células con el vector vacío, CALHM1 o P86L-CALHM1 y se realizó un ensayo de MTT a las 48 h de expresión. Tal y como se

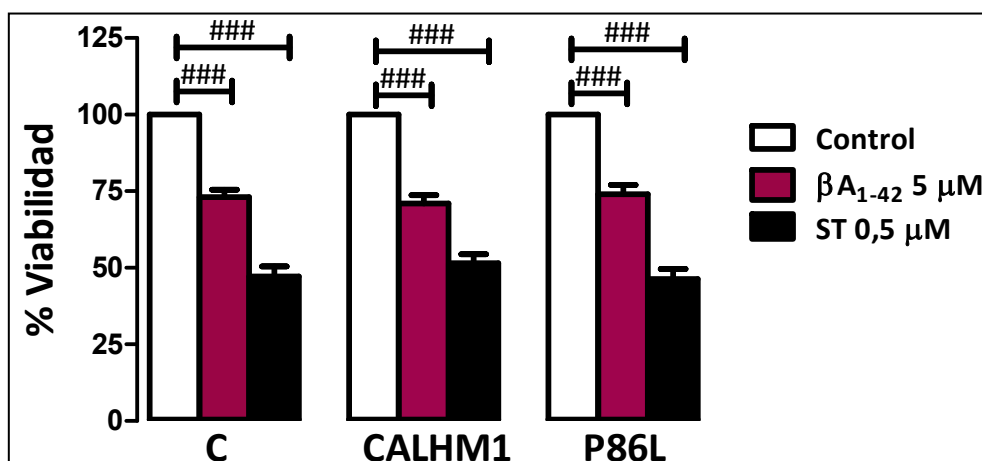


Fig. 64.- El péptido β -amiloide disminuye la viabilidad.

Porcentaje de viabilidad normalizado con respecto a las células sin tratar, determinado mediante un ensayo de MTT en células HeLa transfectadas durante 3,5 h con el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L) y tratadas 13,5 h con el péptido β -amiloide₁₋₄₂ (5 μM) o estaurosporina (ST, 0,5 μM).

aprecia en la Fig. 65a, ni la expresión de la forma nativa del canal ni de la mutada fueron tóxicas para las células, en comparación con las células control. Dado que postulábamos que se trata de un canal de Ca^{2+} abierto constitutivamente (véase la Discusión), se procedió al bloqueo del mismo mediante una alta $[Ca^{2+}]$ durante las 24 h anteriores al ensayo y se determinó la viabilidad: en estas condiciones, tampoco obtuvimos toxicidad por la expresión del canal (Fig. 65b).

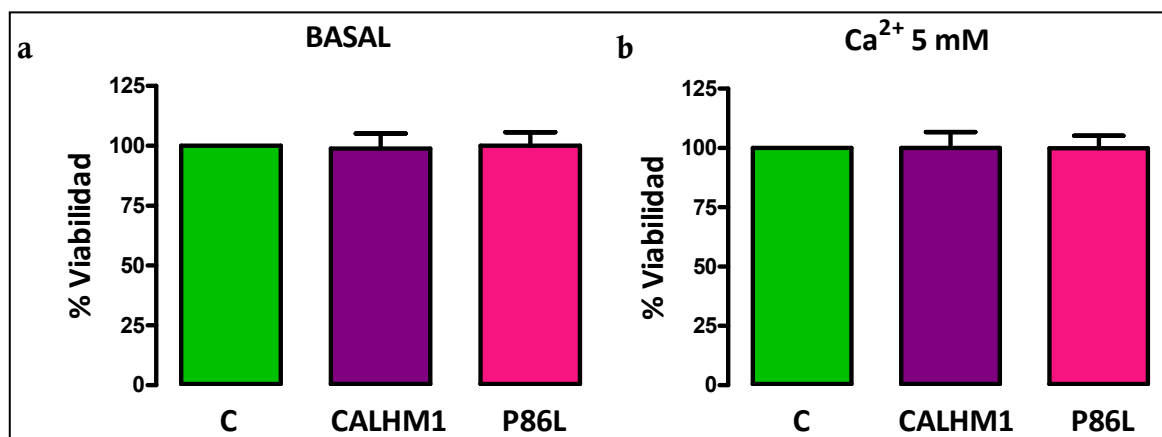


Fig. 65.- La expresión del canal no resulta tóxica para las células HeLa.

a) Porcentaje de viabilidad normalizado con respecto a las células con el vector vacío (C) determinado mediante un ensayo de MTT en células HeLa transfectadas durante 5 h con CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L) tras 48 h de expresión; b) Porcentaje de células viables en las mismas condiciones que las anteriores, pero tratadas 24 h con 5 mM de Ca^{2+} . Datos procedentes de 6 cultivos (por triplicado). Diferencias analizadas con ANOVA y Bonferroni como post-análisis (no hay diferencias significativas).

La siguiente aproximación experimental consistió en determinar si la expresión del canal, nativo o mutado, confería a las células una mayor vulnerabilidad frente al estrés oxidativo. Para ello, se emplearon 2 estrategias utilizadas históricamente en el laboratorio, a saber la utilización del óxido de fenilarsina (PAO) y la combinación de los bloqueantes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial oligomicina A (10 μ M) y rotenona (30 μ M) (O/R).

Según se aprecia en la Fig. 66a, el tratamiento de O/R durante 24 h redujo la viabilidad en las células hasta el 58,8 % en las células control, hasta el 57,81 % en las células que expresaban CALHM1 y hasta el 71,39 % en el caso de las células con P86L-CALHM1.

Por otra parte, la incubación de 2 concentraciones distintas de PAO (1 y 3 μ M) durante 24 h disminuyó la viabilidad de todos los tipos celulares, en torno a un 60 % (Fig. 66b).

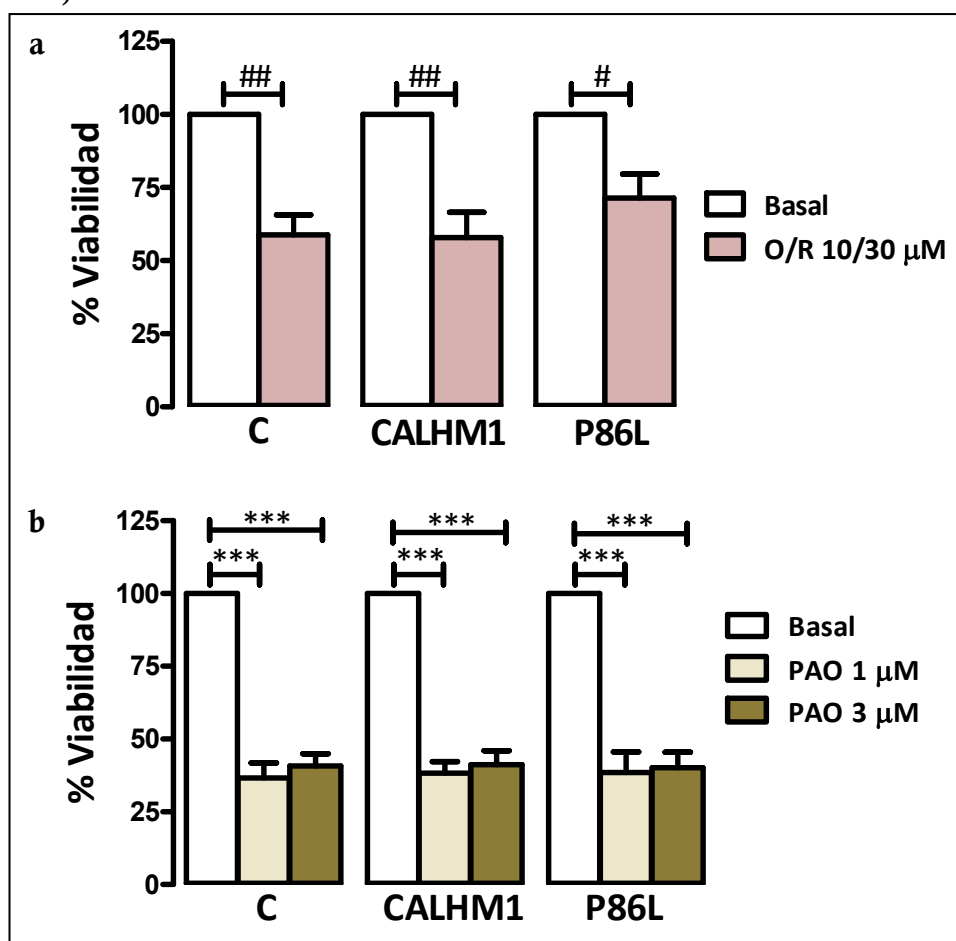


Fig. 66.- El canal no confiere mayor vulnerabilidad frente al estrés oxidativo.

Porcentaje de viabilidad normalizado con respecto a las células sin tratar determinado mediante un ensayo de MTT en células HeLa transfectadas durante 5 h con el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L) tratadas con Oligomicina A (10 μ M) y Rotenona (30 μ M) (a) o PAO, a 1 y 3 μ M (b).

Datos procedentes de 3 cultivos (por triplicado). Diferencias analizadas con el estadístico t-Student, siendo #= $p < 0,05$ y ##= $p < 0,01$; o con ANOVA y Bonferroni como post-análisis, siendo ***= $p < 0,001$.

Por tanto, la expresión del canal, bien sea nativo o mutado, P86L, no incrementa la vulnerabilidad celular frente al estrés oxidativo.

Finalmente, dado que CALHM1/P86L-CALHM1 fueron descritos en el marco de la EA, dirigimos los esfuerzos hacia el estudio de los mecanismos de neurodegeneración fundamentalmente implicados en dicha patología. Para ello, empleamos 2 modelos de toxicidad ampliamente utilizados, a saber, hiperfosforilación de tau, gracias al tratamiento del ácido okadaico y efecto de los oligómeros solubles del β A.

Para analizar si CALHM1/P86L-CALHM1 inducían una mayor toxicidad frente a la hiperfosforilación de tau, se realizó una curva dosis-respuesta del ácido okadaico, utilizando como concentraciones 1, 3, 10 y 30 nM, durante 18 h. Se observó que a 1 y 3 nM, el ácido okadaico no fue tóxico para ningún tipo celular. Sin embargo, a 10 nM se mostró que las células transfectadas con el polimorfismo P86L murieron un 10,51 % más que las células control y las correspondientes transfectadas con CALHM1; este hallazgo resultó muy novedoso, pues muestra cómo P86L-CALHM1 induce selectivamente una mayor vulnerabilidad frente a un estímulo tóxico relacionado con la EA. Por su parte, la administración de 30 nM redujo la viabilidad un 28,1 % en las células control mientras que en las células transfectadas con el canal tal reducción fue de un 44,82 % (para CALHM1) y un 45,66 % (para P86L-CALHM1) (Fig. 67).

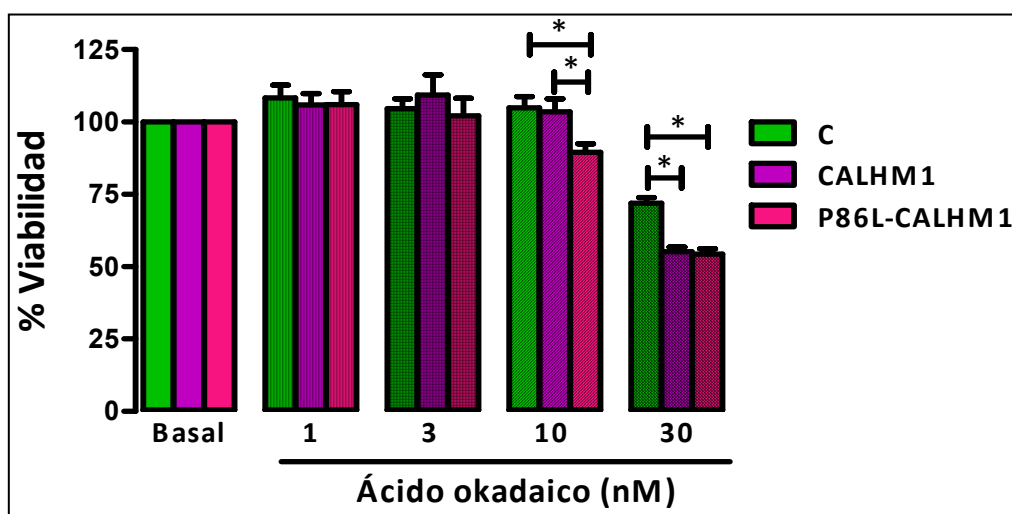


Fig. 67.- **P86L-CALHM1 hace a las células más vulnerables frente al ácido okadaico.** Curva dosis-respuesta del ácido okadaico en células HeLa transfectadas con el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1.

Datos procedentes de 4 cultivos (por triplicado). Diferencias analizadas con ANOVA y Bonferroni como post-análisis, siendo $*=p<0,05$.

Posteriormente, fue de un gran interés determinar el papel de P86L-CALHM1 en la toxicidad del βA , si la hubiere. La primera estrategia a realizar fue la determinación de la viabilidad de las células HeLa tras un tratamiento de con dicho péptido, mediante MTT. Células transfectadas con el vector vacío, CALHM1 o P86L-CALHM1 fueron tratadas con 5 μM de oligómeros solubles de βA_{1-42} durante 24 h. Según se aprecia en la Fig. 68a, el tratamiento no afectó a la viabilidad de las células control ni de las células transfectadas con CALHM1, en comparación con sus respectivas muestras sin tratar; sin embargo, la presencia de P86L-CALHM1 indujo una vulnerabilidad celular frente al βA_{1-42} , reduciendo la viabilidad hasta un 85,86 %. Este efecto deletéreo del canal mutado fue revertido en otros experimentos en los que se incubaba el βA_{1-42} (5 μM) con una alta concentración de Ca^{2+} (5 mM), por lo que el bloqueo de P86L-CALHM1 indujo una protección del 17,12 % (ligeramente mayor que la muerte) (Fig. 68b). Por tanto, P86L-CALHM1 hace a las células más vulnerables frente al péptido βA_{1-42} , mediante un proceso dependiente de Ca^{2+} .

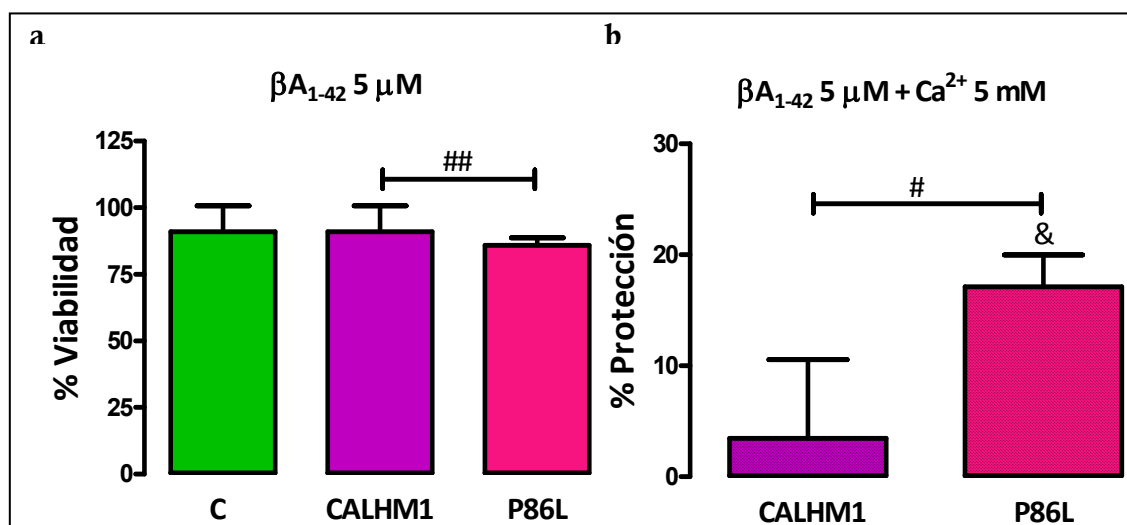


Fig. 68.- **P86L-CALHM1 hace a las células más vulnerables frente al péptido β -amiloide.**

a) Efecto del tratamiento de 24 h de oligómeros solubles del péptido β -amiloide1-42 (5 μM) sobre la viabilidad en células transfectadas con el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1; b) Porcentaje de protección obtenido tras el bloqueo mediante la administración concomitante de 5 mM de Ca^{2+} .

Datos procedentes de 6 cultivos (por triplicado). Diferencias analizadas con t-Student, siendo #= $p < 0,05$; ##= $p < 0,01$ y &= $p < 0,05$, con respecto a su control -células sin tratar-.

Para constatar este descubrimiento, se tomaron imágenes de la morfología celular tras la administración de este tratamiento. Observando la Fig. 69, se aprecia

cómo las células en condiciones basales, son refringentes, tienden a diferenciarse y emitir prolongaciones y presentan una cierta confluencia. Por su parte, las células tratadas con el péptido βA_{1-42} , tienden a encontrarse más redondeadas, síntoma inequívoco de estrés celular; además, las células transfectadas con el polimorfismo P86L tienden a presentarse más redondeadas aún y se advierte una ligera reducción en la confluencia celular.

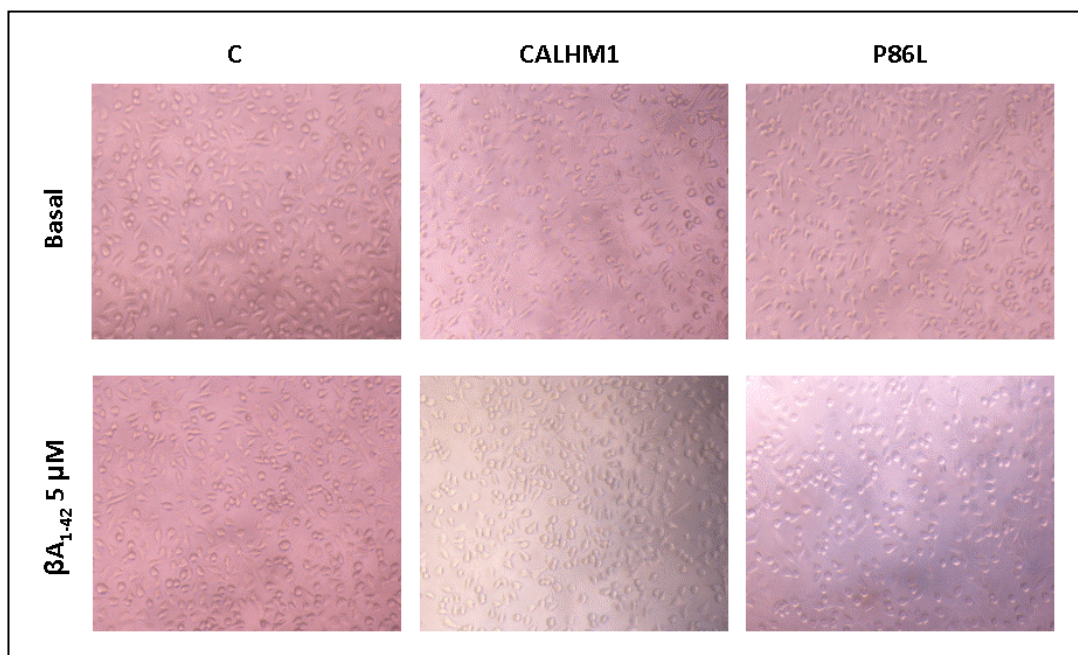


Fig. 69.- **P86L-CALHM1 hace a las células más vulnerables frente al péptido β -amiloide.** Imágenes tomadas de células HeLa (x 200) transfectadas con el vector vacío (C), CALHM1 y P86L-CALHM1 (P86L) y tratadas o no durante 24 h con oligómeros solubles de péptido β -amiloide₁₋₄₂ a una concentración de 5 μ M.

En resumen, en este Trabajo de Investigación, hemos determinado que P86L-CALHM1 hace a las células más vulnerables frente a estímulos tóxicos relacionados con la EA.

8.4.2. Análisis de la activación de apoptosis frente a diversos tóxicos en células HeLa que expresaban P86L-CALHM1

La siguiente etapa de la investigación consistió en averiguar el mecanismo molecular implicado en tal vulnerabilidad. Con este fin, se decidió analizar mediante citometría de flujo si el péptido βA inducía muerte apoptótica.

Para estos experimentos, se utilizó el βA_{25-35} , dado que estaba descrito que esta fracción es la más activa y, por ende, tóxica del péptido. Las células HeLa que sobre-expresaban CALHM1 o P86L-CALHM1, junto a las del vector vacío fueron tratadas durante 24 h con el βA_{25-35} y se tiñeron con IP, con el fin de determinar si se hallaban en apoptosis (para más detalle, véase Materiales y Métodos). Sin embargo, tal y como se aprecia en la Fig. 70, el tratamiento con 5 μM de β_{25-35} no indujo apoptosis en nuestras condiciones experimentales.

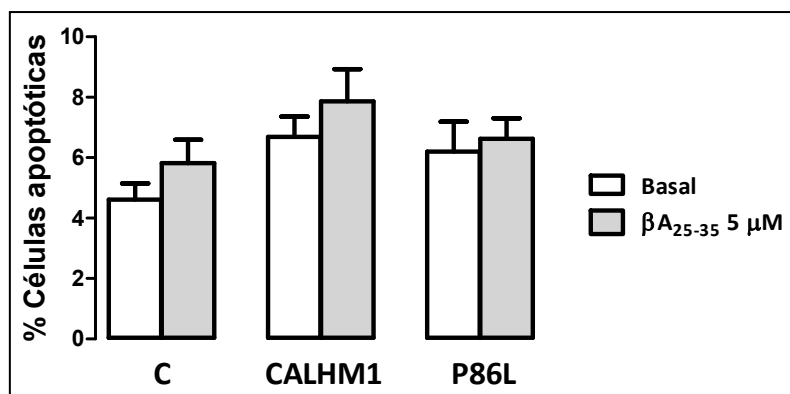


Fig. 70.- El péptido β -amiloide₂₅₋₃₅ no indujo apoptosis.

Porcentaje de apoptosis en células HeLa transfectadas con el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L) y tratadas o no durante 24 h con el péptido β -amiloide₂₅₋₃₅ a una concentración de 5 μM .

Datos obtenidos de 5 cultivos diferentes. No hay diferencias significativas (según t-Student).

Volviendo a los datos expuestos en la Fig. 68, se puede advertir que el rango de muerte fue muy pequeño, de en torno a un 15 %. Por ello, se decidió analizar la apoptosis mediante un kit comercial que permitía analizar más finamente las distintas fases de este mecanismo de muerte y se utilizaron, de nuevo, los oligómeros solubles de βA_{1-42} . Según se aprecia en la Fig. 71b, el tratamiento inició significativamente las fases iniciales de la apoptosis en las células transfectadas con el vector vacío, prácticamente doblando su valor (el cual fue en condiciones basales de 3,575 % y tras el tratamiento, 7,215). Por su parte, el tratamiento no afectó a ninguna de las fases de las células que expresaban CALHM1, de manera que la presencia crónica del βA_{1-42} , cuando CALHM1 se halla sobre-expresado, no fue tóxica. Sin embargo, en las células que expresaban el polimorfismo P86L, la apoptosis temprana se incrementó significativamente 2,32 veces (de 3,613 % de células en células sin tratar a 8,392 % tras el tratamiento); además, la necrosis se vio incrementada significativamente 1,52 veces (pasando de 12,825 % de células en

condiciones basales a 19,546 % de células tras el tratamiento con el βA_{1-42}). Estos datos confirman lo obtenido en los experimentos de MTT.

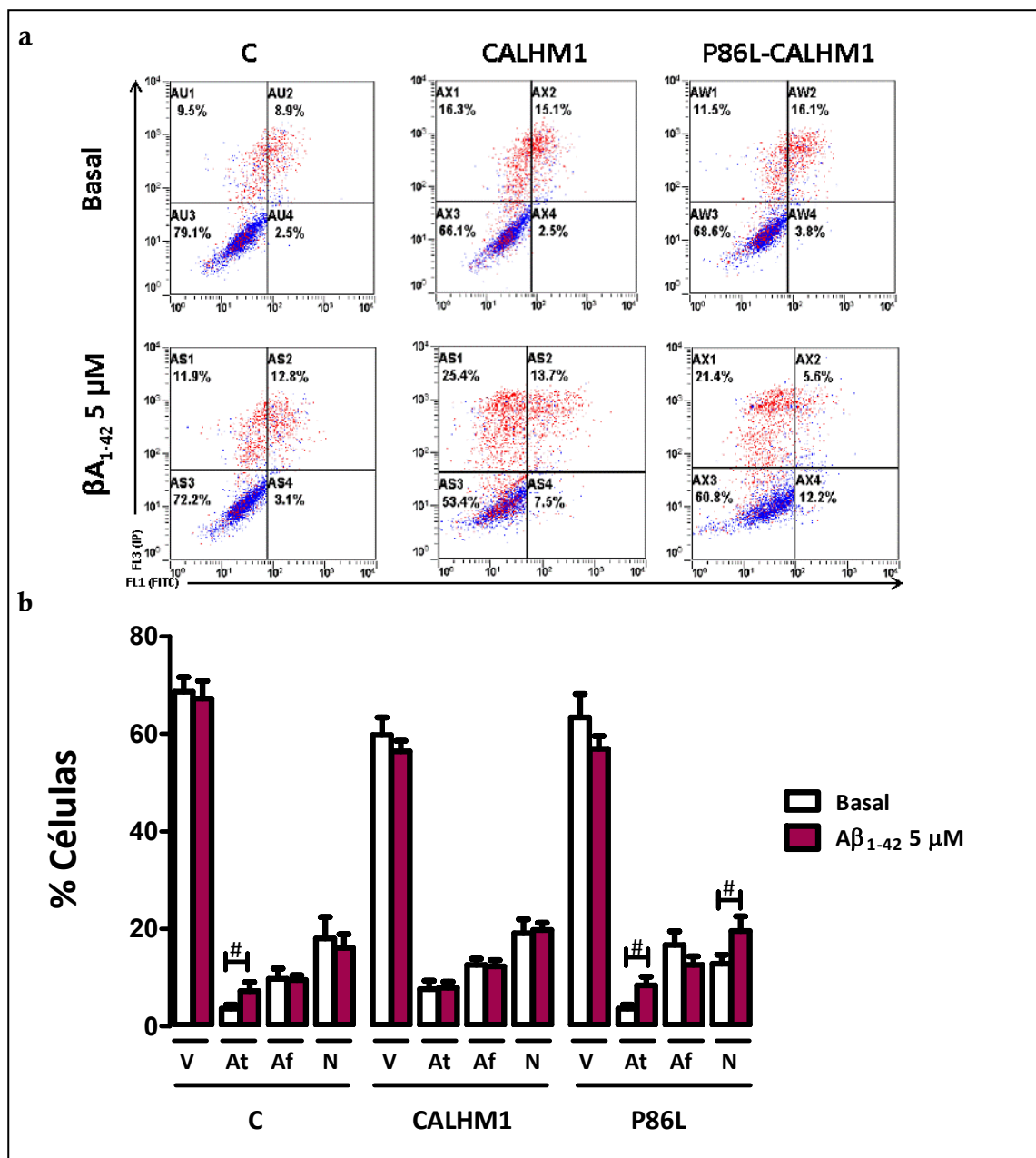


Fig. 71.- El péptido β -amiloide₁₋₄₂ induce apoptosis temprana y necrosis en presencia de P86L-CALHM1.

a) Gráficos típicos tomados del citómetro de flujo en los que se separan las células en función de su complejidad, tamaño y fluorescencia; b) Cuantificación de los resultados de citometría en los que se advierten las fases celulares de Viabilidad (V), Apoptosis temprana (At), Apoptosis final o tardía (Af) y Necrosis (N), de células HeLa transfectadas con el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L), tratadas o no con 5 μM de oligómeros solubles de péptido β -amiloide₁₋₄₂.

Datos obtenidos de 8 cultivos diferentes. Comparación entre medias realizada mediante el estadístico t-Student, siendo $\# = p < 0,05$.

Con el fin de corroborar que existía una activación de la muerte mediante apoptosis, se determinó la actividad de las proteínas clave de dicho mecanismo celular, a saber, las caspasas ejecutoras 3/7.

Para ello, células HeLa transfectadas con el vector vacío, CALHM1 o P86L-CALHM1, fueron sometidas a un tratamiento con oligómeros solubles de βA_{1-42} . 24 h después, se determinó mediante un ensayo luminiscente la actividad de las caspasas (véase sección de Materiales y Métodos para más detalle).

En la Fig. 72 se muestra cómo efectivamente, el tratamiento de βA_{1-42} incrementó la actividad de las caspasas ejecutoras 3/7 de modo significativo únicamente en las células que expresan el polimorfismo P86L-CALHM1. Curiosamente, en las células transfectadas con el vector vacío no solo no hay un incremento en tal activación, sino que con respecto a sus controles -células sin tratar-, se disminuye la actividad basal de estas proteasas.

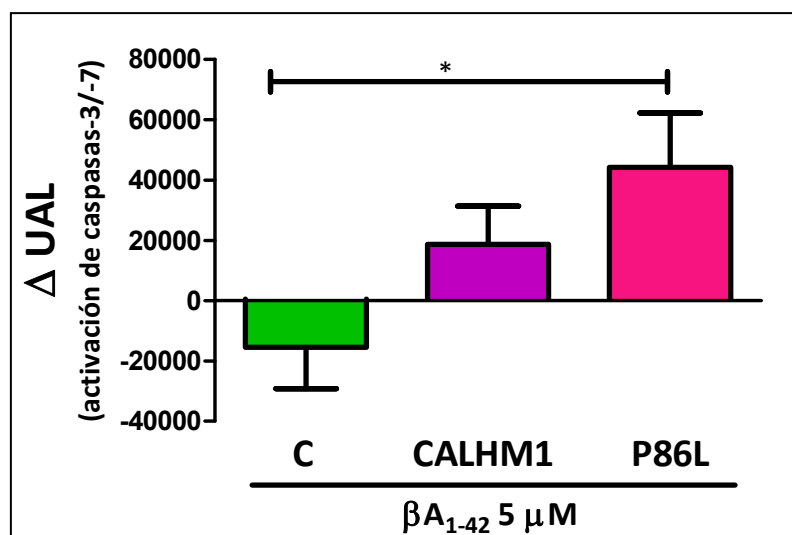


Fig. 72.- El péptido β -amiloide₁₋₄₂ en presencia de P86L-CALHM1 activó las caspasas-3/-7. Activación de las caspasas 3/7 en células HeLa (x 200) transfectadas con el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L) y tratadas durante 24 h con oligómeros solubles del péptido β -amiloide₁₋₄₂ a una concentración de 5 μ M.

Datos obtenidos de 3 cultivos diferentes, por triplicado. Comparaciones entre las medias realizado con un ANOVA Bonferroni como post-análisis, siendo $*=p<0,05$.

Por tanto, P86L-CALHM1 activa la ruta apoptótica en presencia de βA .

8.4.3 Estudio de la toxicidad de la combinación del péptido β -amiloide y P86L-CALHM1 en neuronas hipocampales

Cabe la duda de si este proceso de vulnerabilidad es generalizado o específico de las células HeLa. Con el propósito de investigarlo, se utilizaron células HT22, procedentes de hipocampo de ratón. Estos experimentos se pretendieron abordar mediante la utilización de la fracción tóxica βA_{25-35} ; dadas las novedades experimentales, se precisó variar las condiciones de tratamiento. En un primer momento, se procedió a analizar burdamente con el citómetro de flujo (mediante la determinación de la apoptosis gracias a la tinción de cromatina con IP, véase Materiales y Métodos para más detalles) si el tratamiento durante 24 h de dicho péptido a 5 μM , inducía muerte celular en células transfectadas con el vector vacío, CALHM1 o P86L-CALHM1; ello no ocurrió así (Fig. 73).

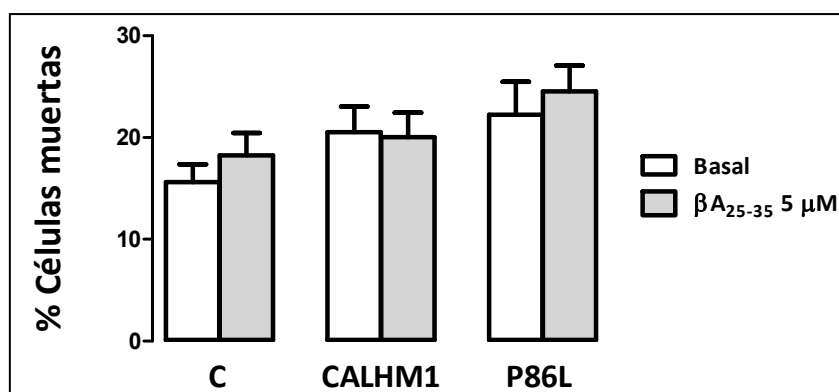


Fig. 73.- El péptido β -amiloide₂₅₋₃₅ no indujo toxicidad en las células HT22. Porcentaje de células muertas en células HT22 transfectadas con el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L) y tratadas o no durante 24 h con el péptido β -amiloide₂₅₋₃₅ a una concentración de 5 μM . Datos obtenidos de 8 cultivos diferentes. No hay diferencias significativas (según t-Student).

Debido a este fracaso experimental, se realizó preliminarmente, mediante MTT, una curva dosis-respuesta y de tiempo para determinar qué condiciones experimentales son óptimas utilizando el βA_{25-35} en las células HT22 transfectadas con la forma nativa del canal, o en sobre-expresando el polimorfismo P86L. La curva, expuesta en la Fig. 74 muestra que con las concentraciones y los tiempos ensayados, no se obtiene una toxicidad significativa con la que se pueda trabajar y la desviación de los datos es muy notable. Quizás, y de manera sutil, a las 12 h del

tratamiento con βA_{25-35} (25 μM), se podrían obtener ciertas diferencias: se eligió esta duración de tratamiento para los siguientes experimentos.

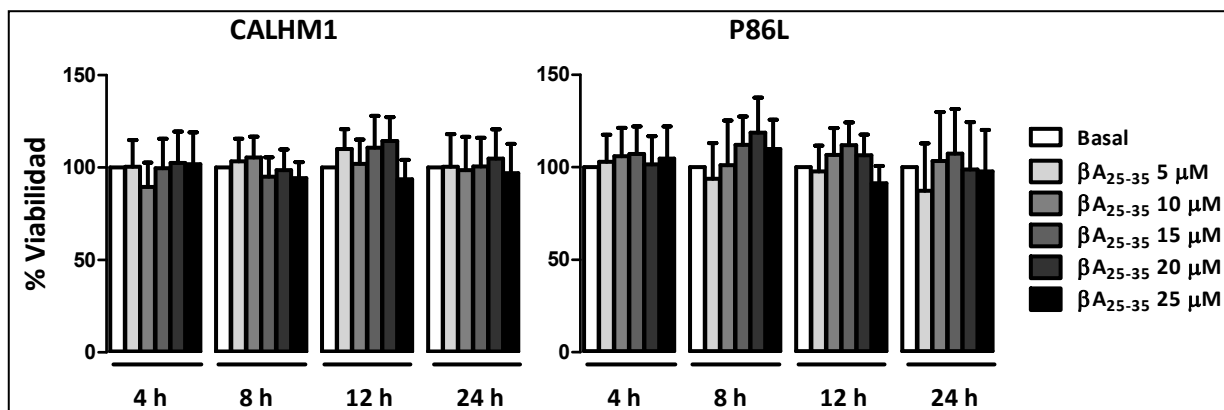


Fig. 74.- El péptido β -amiloide₂₅₋₃₅ no indujo toxicidad a las células HT22, en presencia de CALHM1 y P86L-CALHM1.

Curva dosis-respuesta y temporal del péptido β -amiloide₂₅₋₃₅ en células HT22 transfectadas con CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L).

Datos procedentes de 2 cultivos (por triplicado). Diferencias no significativas (ANOVA y Bonferroni como post-análisis).

Posteriormente, se realizó un nuevo ensayo de MTT confirmatorio, con tratamientos de 12 h del βA_{25-35} , a las concentraciones de 25 y 50 μM .

Tal y como se aprecia en la Fig. 75, bajo estas nuevas condiciones experimentales, las células transfectadas con el vector vacío tendieron a crecer, lo cual sería un hecho curioso, digno de una mayor profundización, que no podremos abarcar en este estudio. Si observamos los resultados de βA_{25-35} 25 μM , se aprecia que solo la forma mutada del canal P86L mostró una viabilidad significativamente menor. Con respecto a la mayor concentración, 50 μM , se advierte que ambas formas del canal promovieron una reducción de la viabilidad, siendo más acusada en presencia de la forma mutada del canal (13 %, frente al 10 % de CALHM1). Las diferencias son muy sutiles, pero pese a ello suficientes. Así las cosas, para el siguiente experimento se eligió como tratamiento la administración de βA_{25-35} a 50 μM durante 12 h.

Finalmente, en las condiciones experimentales elegidas (células HT22 que sobre-expresan CALHM1 y P86L-CALHM1 sometidas a un tratamiento de 12 h con 50 μM de βA_{25-35}), se determinó el mecanismo de muerte inducido por dicho

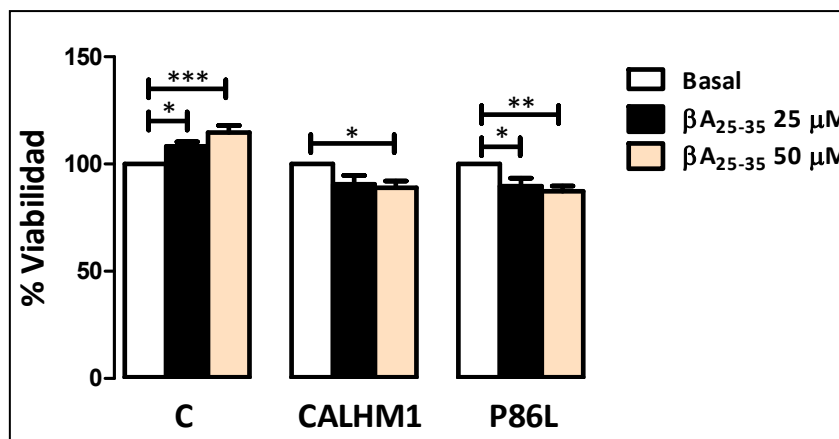


Fig. 75.- El péptido β -amiloide₂₅₋₃₅ indujo muerte a las células HT22 a concentraciones muy altas, especialmente en presencia de P86L-CALHM1.

Curva dosis-respuesta a 12 h del péptido β -amiloide₂₅₋₃₅ en células HT22 transfectadas con el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L).

Datos procedentes de 3 cultivos (por triplicado). Comparación de medias realizada con ANOVA y Bonferroni como post-análisis, siendo $*$ = $p < 0,05$; $**$ = $p < 0,01$ y $***$ = $p < 0,001$.

βA_{25-35} , utilizando el kit comercial empleado anteriormente (véase Materiales y Métodos y Fig. 71b). En estos experimentos, se determinó que la eficacia de la transfección fue de un 30 %, gracias a la co-transfección con una proteína fluorescente derivada de la GFP (en este caso, la sonda sensible a Ca^{2+} Cameleon citosólico YC6.2). En la Fig. 76 se representa cómo la administración del βA_{25-35} en las células HT22 que sobre-expresaban P86L-CAHM1 indujo una activación significativa de la apoptosis temprana, puesto que ésta acaba doblando, prácticamente, los niveles de apoptosis basal (de 11,23 % de apoptosis basal a 19,47 % de apoptosis tras el tratamiento). Ello no ocurre en el caso de las células transfectadas con las células transfectadas con el vector vacío (no mostrado) ni en las que expresan la forma nativa de CALHM1.

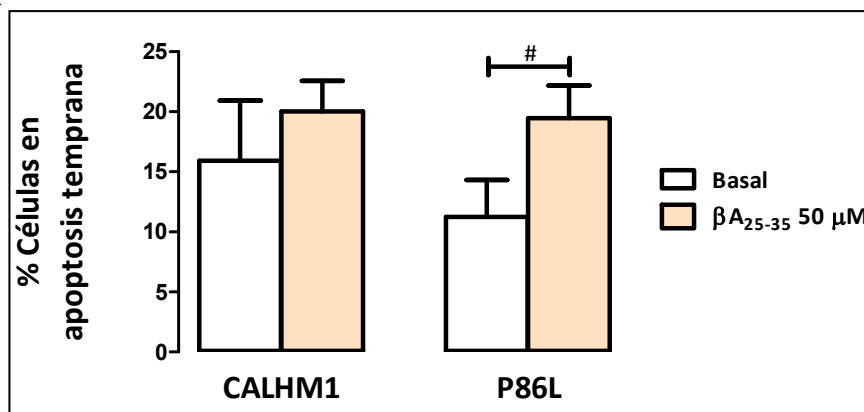


Fig. 76.- El péptido β -amiloide₂₅₋₃₅ inició las primeras fases de la apoptosis solo en presencia de P86L-CALHM1.

Determinación de la inducción de la apoptosis temprana mediante citometría de flujo en células HT22 transfectadas con el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L) en células tratadas o no durante 12 h con 50 μM de péptido β -amiloide₂₅₋₃₅.

Datos procedentes de 3 cultivos. Comparación de medias realizada el estadístico t-Student, siendo $\#$ = $p < 0,05$.

Estos resultados confirman lo observado en las células HeLa. Por tanto, queda demostrado que P86L-CALHM1 incrementa la vulnerabilidad celular frente al péptido β -amiloide, en un mecanismo independiente del tipo celular, que acaba induciendo la activación de la apoptosis temprana.

9.4.4 Determinación de las bases moleculares de la vulnerabilidad inducida por P86L-CALHM1 ante el péptido β -amiloide

El siguiente paso es descubrir el porqué de esa vulnerabilidad. Para determinarlo, hemos analizado dos proteínas fundamentales en las señales de supervivencia celular dependientes de Ca^{2+} y modulables por el βA , a saber ERK1/2 y CREB. En estos experimentos, hemos transfectado a las células HeLa con el vector vacío, CALHM1 o P86L-CALHM1, las hemos tratado durante 1 h con oligómeros solubles del péptido βA_{1-42} y las hemos sometido a una serie de inmunodetecciones por "western blot". Según se aprecia en la Fig. 77a, únicamente las células tratadas con el βA_{1-42} que expresaban P86L-CALHM1 presentaron una menor cantidad de ERK1/2 activa, con respecto a sus células sin tratar; ello puede ser debido a que presenten una menor de proteína basal (Fig. 77b). Por otra parte, también se puede comprobar que estas células poseyeron una menor cantidad de la forma activa del factor de transcripción CREB, lo cual fue comparable con el nivel presente en las células que expresaban CALHM1 (Fig. 77c); esta disminución de la forma activa de CREB se correlaciona con una menor cantidad de CREB total (Fig. 77d).

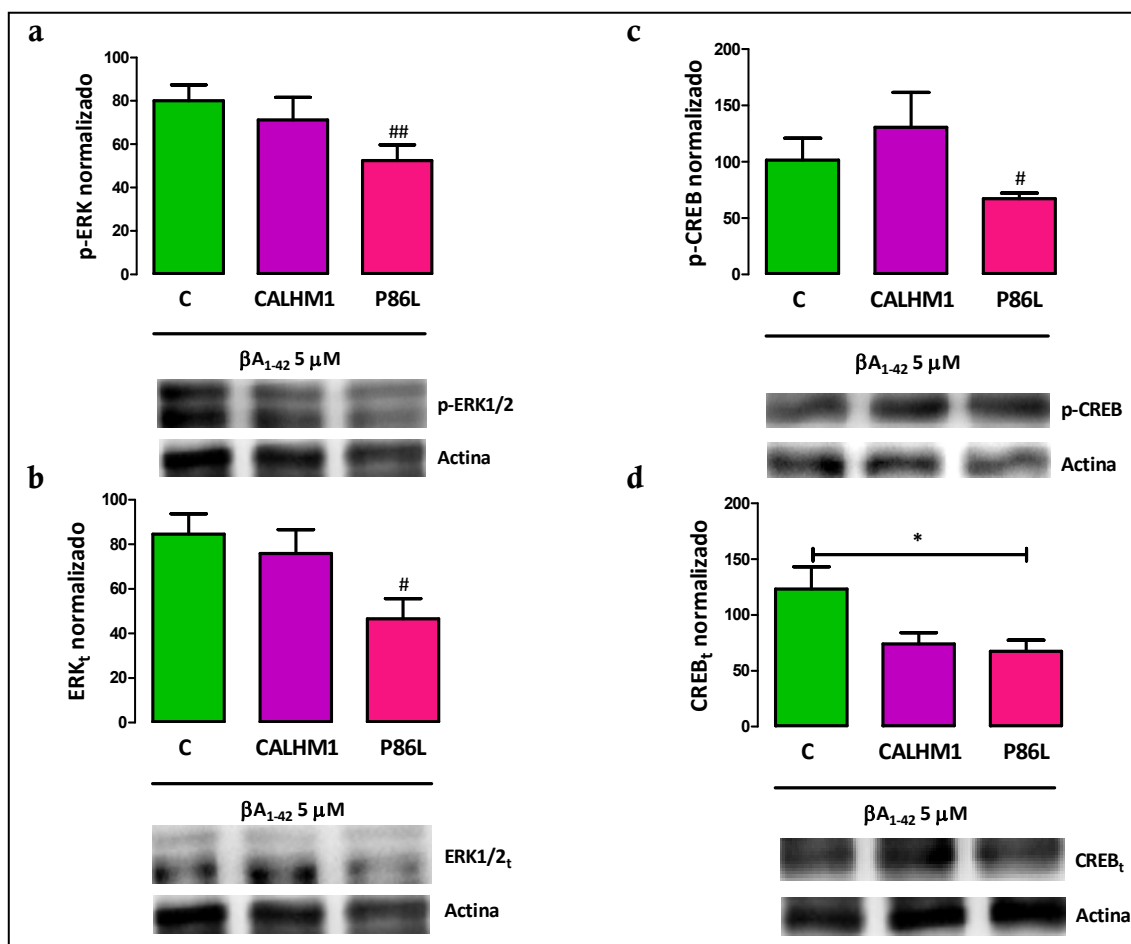


Fig. 77.- El péptido β -amiloide₁₋₄₂ a través de P86L-CALHM1 redujo la expresión y activación de proteínas pro-vida.

a) Expresión de la proteína tERK; b) Expresión de ERK total; c) Expresión de pCREB y d) Expresión de CREB total en células HT22 transfectadas con el vector vacío (C), CALHM1 o P86L-CALHM1 (P86L) en células tratadas 1 h con 5 μ M de oligómeros solubles del péptido β -amiloide₁₋₄₂.

Datos procedentes de 5 cultivos. Comparación de medias realizada el estadístico t-Student, siendo $\# = p < 0,05$ y con ANOVA y Bonferroni como post-análisis, siendo $* = p < 0,05$.

En resumen, P86L-CALHM1 incrementa la vulnerabilidad a diversos estímulos tóxicos relacionados con la EA, como el β A, probablemente por un mecanismo que implica la reducción de los niveles de proteínas defensivas frente a un estrés, tales como ERK1/2 o CREB.

~~~~~9. DISCUSIÓN

10. DISCUSIÓN

El canal de Ca^{2+} CALHM1 se comenzó a estudiar por el grupo de Philippe Marambaud al haber hallado que el polimorfismo P86L-CALHM1 parecía relacionarse con la aparición de la EA (Dreses-Werringloer y col., 2008); sin embargo, aún en la actualidad la relación entre P86L-CALHM1 y el riesgo de padecer EA sigue siendo muy controvertida (Boada y col., 2010; Cui y col., 2010; Giedraitis y col., 2010; Lambert y col., 2010; Nacmias y col., 2010; Shibata y col., 2010; Tao y col., 2014). Desde su descubrimiento en 2008, se ha intentado modular farmacológicamente CALHM1, aunque solo se ha logrado inhibir el canal con compuestos bloqueantes de canales de Ca^{2+} muy inespecíficos y a altas concentraciones (Dreses-Werringloer y col., 2008; Ma y col., 2012; Siebert y col., 2013; Tanis y col., 2013). Por otra parte, se sabe que este polimorfismo promueve la formación del βA y altera la homeostasia del Ca^{2+} , y la activación subsecuente de determinadas vías de señalización intracelular (Dreses-Werringloer y col., 2008; Siebert y col., 2013). Sin embargo, no se ha llegado a inferir el mecanismo a través del cual P86L-CALHM1 podría estar implicado en la neurodegeneración característica de la EA. Por ello, a lo largo de la presente Tesis Doctoral, se han pretendido abordar tales cuestiones.

Iniciamos los experimentos determinando la eficacia y la eficiencia de la transfección, así como la localización subcelular de estos canales. Una limitación importante a la hora de llevar a cabo este Proyecto es que el constructo de CALHM1 o P86L-CALHM1 careciera de un marcador fluorescente que permitiera determinar visualmente qué células se hallaban transfectadas, aunque sí tenía otro marcador (c-Myc) que se podía detectar por "western blot". Por ello, en la mayoría de los experimentos, se han realizado co-transfecciones, las cuales incrementan la eficiencia de transfección (Brini y col., 1999) y en muchas de ellas se han empleado proteínas fluorescentes (Figs. 33, 37, 39 y 40), de manera que se pueda asumir que la célula

fluorescente habrá expresado ambas proteínas; también se han realizado inmunotinciones utilizando un anticuerpo dirigido contra CALHM1 (Fig. 34a), o mediante fluorescencia (Figs. 34b, 35, 37, 39 y 40) y "western blot" (Fig. 32), contra el epítipo c-Myc que sí portaba el ADNc del canal. En todas estas aproximaciones, se ha advertido que la eficiencia de transfección es muy alta: en torno a un 80 % para las células HeLa, un 50 % para las células SH-SY5Y y un 30 % para la línea HT22. Los experimentos en los que se detectaba así el canal, se han llevado a cabo en poblaciones celulares, lo que posibilita la amplificación de las señales mediadas por él y facilita la detección de estas (como ocurre con las medidas de Ca^{2+} mediante ecurinas).

Posteriormente, se estudió el anclaje de CALHM1 y su polimorfismo P86L en distintas estructuras intracelulares, mediante la co-expresión del canal con quimeras de la GFP dirigidas genéticamente a mitocondria y RE.

Ma y colaboradores (2012) describieron en un modelo de expresión heteróloga que el canal se expresaba en la membrana plasmática (Ma y col., 2012), lo cual ha sido corroborado, esta vez, en células de mamífero (HeLa, Fig. 34a).

Además, se ha demostrado la distribución intracelular del canal: Por una parte, CALHM1 y P86L-CALHM1 se anclaban a las membranas del RE (Fig. 40), incluso conformando la envoltura nuclear (Fig. 35). Por otra parte, el grupo de Philippe Marambaud advirtió que la forma nativa del canal se hallaba presente en el lumen del RE, puesto que co-localizaba con la chaperona GRP78 (Dreses-Werringloer y col., 2008); hemos corroborado este hallazgo, pues en nuestros experimentos, el canal también se co-expresaba con proteínas reticulares, tales como la calreticulina (Fig. 39) y una proteína verde fluorescente dirigida a RE (RE-GFP) (Fig. 40).

A la luz de nuestros experimentos, parece ser que CALHM1/P86L-CALHM1 se podrían localizar, al menos de manera parcial, en las mitocondrias, o próximos a ellas (Fig. 37).

Por tanto, se puede concluir que CALHM1 y P86L-CALHM1 se expresan fundamentalmente en la membrana plasmática. Sin embargo, la expresión del canal no se restringe únicamente a estas organelas, pues se apreció un marcaje por toda la célula (Figs. 37, 39 y 40). Cabe la posibilidad de que al ser CALHM1 una proteína de membrana plasmática, aparezca distribuido a lo largo de toda la vía secretora de las proteínas, la cual incluye el RE y el complejo de Golgi (formado, a su vez, por el aparato de Golgi y las vesículas secretoras) (Thiele y col., 1997).

Una vez realizadas estas premisas, se comenzaron los experimentos encaminados a dar respuesta a los objetivos marcados para este Trabajo de Investigación.

El Ca^{2+} es una señal intracelular altamente regulada, esencial para la transducción de numerosos estímulos; una alteración en su fino control puede desencadenar, por ejemplo, alteraciones en la plasticidad y en la supervivencia neuronales (Berridge, 2012; 2013 y 2014). Además, las patologías nerviosas, como la EA, se caracterizan por una clara dishomeostasia en el Ca^{2+} tanto a nivel neuronal, como glial (Selkoe, 2002; LaFerla, 2002; Bezprozvanny y Mattson, 2008; Berridge, 2010).

Por otra parte, CALHM1, se expresa en células de linaje neuronal. La expresión de la forma mutada del canal P86L-CALHM1 promueve la acumulación de βA y altera la permeabilidad de las membranas al Ca^{2+} (Dreses-Werringloer y col., 2008). Siendo CALHM1 (así como su polimorfismo P86L) un canal de Ca^{2+} , y debido a la escasa literatura acerca de la señal de Ca^{2+} que media, hemos contribuido al conocimiento de la regulación de la homeostasia del Ca^{2+} por el mismo, en distintos compartimentos subcelulares, a saber, citosol, RE, mitocondria y núcleo.

Ya que CALHM1/P86L-CALHM1 se hallan expresados en el RE, fue de interés determinar si ello implica la alteración de una de las funciones más importantes de esta organela, a saber: el almacenamiento de Ca^{2+} . El RE está conformado por un sistema de endomembranas cuya función es principal almacenar, modificar y transportar proteínas recién sintetizadas. Además, el lumen del RE es un gran reservorio de Ca^{2+} intracelular, de manera que las $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ pueden hallarse en el rango desde micro a milimolar; para esta función, el RE está dotado de elementos indispensables como la SERCA, que introduce Ca^{2+} en contra de gradiente, diversos canales de Ca^{2+} , como los RIP_3 o los RRi y proteínas quelantes de Ca^{2+} , como la calsecuestrina, o las chaperonas GRP94, GRP78, calnexina y calreticulina. Especialmente interesantes resultan estas chaperonas, pues regulan tanto la calidad de las proteínas como los niveles de Ca^{2+} reticular, de manera que cuando hay alteraciones de una u otro, se generan señales de estrés reticular, que acaban conllevando la muerte de la célula (Krebs y col., 2011; Stutzmann y Mattson, 2011).

En nuestros experimentos, se analizó el contenido de Ca^{2+} en el RE, indirectamente, mediante la medida en la mitocondria de la liberación de Ca^{2+} procedente del RE. Tal liberación fue inducida por un pulso de histamina, la cual, a través del IP_3 como mensajero intracelular, activa los RIP_3 del RE. El Ca^{2+} procedente del RE es finamente detectado por la mitocondria, debido a la estrecha relación física-funcional existente entre ambas organelas (Rizzuto y col., 2004; Pizzo y Pozzan, 2007). Con estas premisas, se ha determinado que la expresión de CALHM1 y P86L-CALHM1 reduce el contenido de Ca^{2+} del RE de las células HeLa, pues la administración de un pulso de histamina conllevó una señal de Ca^{2+} mitocondrial menor (Figs. 45 y 46b) y más rápida (Figs. 46c y d), con respecto a las células control; ello podría ser debido a que quizás este canal esté conformando un poro de "goteo" del Ca^{2+} desde el RE (Moreno-Ortega y col., 2010), lo que explicaría el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ basal apreciable en la Fig. 45, o el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ basal de las Figs. 49, 50a, 51 y 52a. Este resultado fue corroborado poco después por el grupo dirigido por el Prof. Javier García-Sancho, de la universidad de Valladolid: Demostraron que el RE de las células transfectadas con CALHM1 capta y libera más rápidamente Ca^{2+} , siendo la acumulación de Ca^{2+} en el RE menor; ello puede ser debido a que el canal conforme un poro de salida de Ca^{2+} desde el RE y a que module tanto la afinidad, como la capacidad de transporte de Ca^{2+} de SERCA. Además, esta disminución del Ca^{2+} reticular se acompaña de la expresión de marcadores de estrés reticular, tales como CHOP, ERdj4, GRP78 y XBP1 (Gallego-Sandín y col., 2011), lo cual se presenta a lo largo de la evolución de la EA (Lindholm y col., 2006; Sammels y col., 2010; Viana y col., 2012).

Por otra parte, la presencia y funcionalidad de CALHM1 en la membrana plasmática quedó demostrada en distintos modelos celulares, como HT22 y PC12 (Dreses-Werringloer y col., 2008). Sin embargo, los experimentos que aquí mostramos realizados en las células HeLa reflejan, por primera vez, la cinética completa de la entrada y salida de Ca^{2+} en el citosol mediada por CALHM1 y P86L-CALHM1 (Fig. 41).

La apertura de este canal de Ca^{2+} se consigue mediante el protocolo de reintroducción de Ca^{2+} , en el que las células se perfunden con una solución salina con 0 Ca^{2+} , que se acaba intercambiando por otra con una $[\text{Ca}^{2+}]$ fisiológica. La perfusión con 0 Ca^{2+} conlleva a la depleción de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} , debido al gradiente

electroquímico del catión establecido en estas condiciones; el vaciamiento de estos almacenes, como el RE, genera una corriente de entrada de Ca^{2+} muy patente cuando se reintroduce Ca^{2+} a la solución extracelular, cuyo fin es el rellenado de los mismos: se trata de la entrada capacitativa de Ca^{2+} o entrada de Ca^{2+} dependiente de almacenes (Parekh y col., 1993), la cual está mediada por el acoplamiento y oligomerización de las proteínas STIM1 y Orai1 (Smyth y col., 2006). Un ejemplo de este tipo de señal es la que apareció en las células control de la Fig. 41. Como se aprecia en el registro, la señal de Ca^{2+} se vio incrementada, al reintroducirse Ca^{2+} en la solución extracelular, y tuvo carácter transitorio, pues Orai1 presenta un dominio de Glu sensible a Ca^{2+} que inactiva rápidamente al canal (Scrimgeour y col., 2012) y, además, la célula tiende a mantener los niveles de Ca^{2+} citosólicos muy bajos, mediante diversos mecanismos de aclaramiento de Ca^{2+} (entrada de Ca^{2+} a la mitocondria a través del mUP y al RE, gracias a la SERCA y salida de Ca^{2+} al exterior celular mediante únicamente la PMCA, pues las células HeLa carecen de mpNCX) (Berridge y col., 2013; Fig. 6).

Por su parte, en presencia de CALHM1, la señal de Ca^{2+} fue mucho mayor ante la reintroducción de Ca^{2+} (Fig. 41 y 42 a y b) que la obtenida en las células control mediante la entrada capacitativa. Ello es debido a que, por una parte, este protocolo despolariza ligeramente las células y, por otra, el canal detecta las variaciones de la distinta $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular, induciéndose mediante ambos mecanismos su apertura, y la entrada masiva de cationes, fundamentalmente Ca^{2+} (Ma y col., 2012). Esta entrada de Ca^{2+} genera una hiperpolarización en la membrana que causa la inactivación posterior del canal (Ma y col., 2012). Los mecanismos de aclaramiento son relativamente eficaces, pues la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ basal tras el pulso de Ca^{2+} permanece solo ligeramente elevada.

Aunque el grupo del Prof. Foskett describiera que el polimorfismo P86L no altera las propiedades biofísicas del canal (Ma y col., 2012), nosotros, junto a otros (Dreses-Werringloer y col., 2008) hemos comprobado que P86L-CALHM1 es mucho menos permeable al Ca^{2+} , dado que en comparación con la forma nativa, a su través difundió mucha menor cantidad de Ca^{2+} (Figs. 41 a y b), y la activación y subsecuente entrada de Ca^{2+} , así como su inactivación fueron mucho más lentas (Figs. 41 y 42 c y d). Esto ocasionó que haya durante más tiempo una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ elevada, lo que puede desencadenar en la activación aberrante de procesos dependientes de Ca^{2+} , como la activación de calpaínas, por ejemplo, así como una sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} . Ello se puede correlacionar con el hecho de que, durante la EA, se presenta una clara

dishomeostasia del Ca^{2+} que conlleva alteraciones funcionales en la mitocondria, en el RE, en las proteínas del citoesqueleto (como tau), y en la sinapsis, entre otros (Bezprozvanny y Mattson, 2008; Wojda y col., 2008; Camandola y Mattson, 2011).

Para explorar si P86L-CALHM1 provocaba una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, se realizó el mismo protocolo de activación del canal midiendo la $[\text{Ca}^{2+}]$ de la matriz mitocondrial mediante la AEQ mitocondrial. Según se advierte en las Figs. 43 y 44, y comparándolas con las Figs. 41 y 42, la mitocondria percibió de manera muy fidedigna la señal de Ca^{2+} citosólica, de manera que se observan las notables diferencias existentes entre la entrada capacitativa de Ca^{2+} de las células control y señal de Ca^{2+} la mediada por CALHM1 y por P86L-CALHM1. De hecho, se apreció cómo en las células que expresan el polimorfismo, quedó un remanente de Ca^{2+} mitocondrial más elevado que lo que ocurre en las que expresan la forma nativa del canal; ello podría generar una cierta vulnerabilidad celular, pues a pesar de la gran capacidad tamponadora de Ca^{2+} que posee la mitocondria, elevadas $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ conllevan a la apertura del mPTP y, por ende, a la muerte celular (Kroemer y col., 1997). Por otra parte, tal y como se aprecia en los registros de Ca^{2+} mitocondrial de la Fig. 45, la expresión del canal, tanto nativo, como mutado, indujo un notable incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$; ello es compatible con el hecho de que CALHM1 conforme un canal de tipo "goteo" en el RE (Gallego-Sandín y col., 2011) y la mitocondria detecte ese Ca^{2+} reticular fielmente. Por tanto, CALHM1 incrementan los niveles de Ca^{2+} mitocondrial y la activación de P86L-CALHM1 genera un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ sostenido en el tiempo. En este contexto, es de resaltar que las personas que portan el polimorfismo P86L presentan esta ligera sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial a lo largo de toda su vida y, además, la activación del canal P86L promueve la liberación de βA_{1-40} y βA_{1-42} (Dreses-Werringloer y col., 2008); ambos mecanismos citotóxicos (una excesiva $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ y niveles elevados de βA) convergen en la mitocondria, favoreciendo el desarrollo y la progresión de la EA (Celsi y col., 2009).

Otra organela en la que el Ca^{2+} juega un papel determinante es el núcleo, pues la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ controla numerosos procesos, desde la expresión génica hasta la síntesis y reparación del ADN (Bachs y col., 1992). La homeostasia del Ca^{2+} nuclear está regulada, por una parte, por el Ca^{2+} citosólico, el cual difunde al núcleo a través de los

complejos de los poros nucleares (Allbritton y col., 1994), y, por otra parte, por elementos propiamente nucleares, tales como los receptores situados en la cara intranuclear de la envoltura nuclear (RIP₃s, RRis y NAADPRs), o el retículo nucleoplásmico (de naturaleza similar al RE) (Bootman y col., 2009). Uno de los factores de transcripción regulados tanto por la $[Ca^{2+}]_{cit}$, como por la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ mejor conocidos es CREB¹³⁰, el cual está implicado, entre otras funciones, en la plasticidad sináptica, ejerciendo un papel clave en la potenciación perdurable (Lee y Silva, 2009). Resultó de interés explorar el papel de CALHM1 en la homeostasia del Ca^{2+} nuclear, teniendo en cuenta ambos mecanismos de regulación.

En un primer momento, se registraron los incrementos en la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ subsecuentes a la activación del canal; para ello, se realizaron protocolos de reintroducción de Ca^{2+} en células en las que se expresaban una AEQ dirigida al nucleoplasma y el vector vacío, CALHM1 o P86L-CALHM1. Según las Figs. 47 y 58a, durante la perfusión de la solución con 0 Ca^{2+} , se advirtió un incremento en la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ basal en presencia de CALHM1/P86L-CALHM1; ello pudiera ser debido a que CALHM1 podría estar conformando un canal de tipo goteo en el RE (Moreno-Ortega y col., 2010; Gallego-Sandín y col., 2011), de manera que, dada su proximidad, el núcleo detecta fielmente este goteo de Ca^{2+} reticular. Por su parte, la reintroducción de Ca^{2+} indujo en el núcleo una señalización de dicho catión con un patrón similar a lo que ocurre en el citosol (Fig. 41): la entrada capacitativa de las células control incrementó muy ligera y transitoriamente la $[Ca^{2+}]_{nuc}$; la activación de CALHM1 conllevó una gran oscilación de Ca^{2+} en el nucleoplasma, que tendió a desvanecerse a lo largo del registro; por su parte, la señal de Ca^{2+} nuclear subsecuente a la activación del P86L-CALHM1 expresado en la membrana plasmática, fue menor que la que indujo CALHM1, pero mucho más lenta, tanto que a lo largo del registro los elementos de aclaramiento del Ca^{2+} nuclear (básicamente, difusión hacia el citosol a través de los complejos de los poros nucleares y el NCX nuclear -la porción interna de la envoltura nuclear carece de SERCA- (Bootman y col., 2009)), no son capaces de disminuir este incremento, por lo que la activación de P86L-CALHM1 conllevó una señal de Ca^{2+} nuclear sostenida en el tiempo (Figs. 47 y 48b, c, d y e). Esta diferencia en la señalización de Ca^{2+} nuclear mediada por ambas formas del canal es

¹³⁰ CREB: Del inglés (cAMP-response element binding protein), proteína de respuesta a la unión del AMPc

especialmente relevante, pues la expresión de numerosas proteínas es, frecuentemente, dependiente del Ca^{2+} nuclear.

Posteriormente, se analizó la señalización de Ca^{2+} nuclear mediada por elementos constituyentes del núcleo como son los RIP_3 , utilizando como estímulo la histamina y registrando el Ca^{2+} nuclear con la AEQ dirigida al nucleoplasma (Brini y col., 1994a). La histamina, una vez unida a su receptor de membrana, activa una proteína G, la cual activará mediante fosforilación a la fosfolipasa C de fosfoinosítidos de membrana, a los que hidrolizará, generando IP_3 y diacilglicerol. El IP_3 se une a los RIP_3 del RE, o bien difunde a través de los complejos de los poros nucleares, internalizándose en el nucleoplasma, desde donde puede activar los RIP_3 de la envoltura nuclear; tal activación promoverá un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$, al liberar el Ca^{2+} del retículo nucleoplásmico. Por tanto, un pulso de histamina generará en el núcleo una señal de Ca^{2+} originada desde el propio núcleo, pero también procedente del citosol (Chamero y col., 2008; Alonso y García-Sancho, 2011). Sin embargo, es común que la señal de Ca^{2+} nuclear tenga una menor entidad que la del citosol (Chamero y col., 2008), e incluso, no toda señal de Ca^{2+} citosólico genera en las células HeLa un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ (Badminton y col., 1996), lo cual es debido a factores como que la difusión libre del Ca^{2+} a través de los complejos de los poros nucleares no sea unívoca, que las mitocondrias perinucleares puedan estar tamponando el Ca^{2+} antes de que llegue al nucleoplasma, que los RIP_3 expresados en la envoltura nuclear tengan una baja afinidad al IP_3 o que el núcleo tenga algún sistema de tamponamiento del Ca^{2+} que evite incrementos exagerados de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ (Badminton y col., 1996; Gerasimenko y Gerasimenko, 2004; Chamero y col., 2008; Alonso y García-Sancho, 2011). Teniendo en mente toda esta complejidad, se realizaron los experimentos. Según se vislumbra en las Figs. 49 y 50a, la mera expresión de CALHM1 y P86L-CALHM1 incrementó la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ basal, cuando las células se hallan perfundidas con una solución salina que presenta una $[\text{Ca}^{2+}]$ fisiológica; estos datos son parejos a lo hallado cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular era 0 Ca^{2+} (Figs. 47 y 48a); tal y como se ha comentado anteriormente, probablemente, el canal del RE - o incluso el expresado en la envoltura nuclear (Fig. 35)- esté "goteando" Ca^{2+} , lo cual es detectado fácilmente en el núcleo. Por su parte, y a diferencia de lo que ocurre en el RE (Figs. 45 y 46), cuando se administró un pulso de histamina, se indujo un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ transitorio, de igual magnitud en las células transfectadas con el vector vacío, CALHM1 o P86L-CALHM1 (Figs. 49 y 50b, c, d y e), lo que

sugiere que esta señal de Ca^{2+} nuclear es independiente del Ca^{2+} proveniente del RE y del citosol, o bien que la entrada de Ca^{2+} al núcleo no se vea termodinámicamente favorecida, dada la elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ basal. El bloqueo de los RIP_3 mediante 2-APB no produjo diferencias significativas (Figs. 50b, c, d y e), por lo que CALHM1 y su polimorfismo P86L no guardarían ninguna relación funcional con los IP_3 . Por tanto, CALHM1/P86L-CALHM1 únicamente provocan un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ basal.

Dado que CALHM1 media una importante señal intracelular de Ca^{2+} , a distintos niveles subcelulares, incluido el núcleo, el siguiente paso lógico fue determinar qué vías de señalización son subsecuentemente activadas. El grupo de Philippe Marambaud realizó un elegante estudio de ello: en células HT22 llevaron a cabo un protocolo de reintroducción de Ca^{2+} tras el cual realizaron un completo cribado de proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} . Demostraron que el trasiego de Ca^{2+} a través de CALHM1 promueve la fosforilación y, por ende, la activación de las proteínas cinasas ERK¹³¹, p38, Akt, MSK1/2¹³², MEK1/2¹³³, RSK1/2/3¹³⁴ y CREB. La proteína cinasa activadora de dicha vía es la GTPasa¹³⁵ pequeña llamada Ras. Además observaron que la activación de esta vía se produce rápidamente, en protocolos de reintroducción de Ca^{2+} a tiempos cortos (10 min), pues cuanto más largo es el protocolo, menor activación de cinasas se aprecia. La constatación de que la activación de CALHM1 (y el consiguiente flujo de Ca^{2+} al interior celular a su través) conlleva la activación de Ras/MEK/ERK/RSK/MSK/CREB la obtuvieron bloqueando el canal con Zn^{2+} y Gd^{3+} ; quelando el Ca^{2+} intracelular con BAPTA-AM¹³⁶ y alterando las propiedades del canal al modificarlo estructuralmente, pues tales acciones inhiben la activación de ERK1/2, RSK1/2/3 y MSK1. Por su parte, P86L-CALHM1, que presenta una menor permeabilidad al Ca^{2+} , disminuye notablemente la activación de vía de señalización intracelular

¹³¹ ERK: Del inglés, "Extracellular Regulated Kinases", son las proteínas cinasas reguladas extracelularmente

¹³² MSK1/2: Acrónimo inglés de "Mitogen- and Stress-activated Kinase" que designa a las cinasas 1/2 activadas por mitógeno y estrés

¹³³ MEK1/2: Cinasas 1/2 de la proteína cinasa de especificidad dual activada por mitógenos (del inglés "dual specificity Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2")

¹³⁴ RSK1/2/3: Proteína cinasas 1-3 de la subunidad S6 ribosomal de 90 kDa

¹³⁵ GTPasa: Hidrolasa de trifosfato de guanidilo

¹³⁶ BAPTA-AM: (Acetoximetil)éster del ácido tetrakis 1,2-bis(2-amino-5metilfenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético

Ras/MEK/ERK/RSK/MSK/CREB. Además, en las neuronas deficitarias de CALHM1 procedentes del ratón nulo para este gen, el protocolo de reintroducción de Ca^{2+} no activa esta ruta de señalización intracelular, pese a que los niveles de las proteínas inactivas sean similares a los de las neuronas silvestres, lo que demuestra, en condiciones más fisiológicas, el papel de CALHM1 en la señalización intracelular (Dreses-Werringloer y col., 2013).

En nuestro laboratorio, hemos indagado en la señalización intracelular en condiciones que preveíamos eran las más tóxicas de CALHM1/P86L-CALHM1. En vez de activar el canal, tal y como hace el grupo del Dr. Philippe Marambaud (Dreses-Werringloer y col., 2013), se ha incubado el βA_{1-42} , en forma de oligómeros solubles; esta aproximación es válida en el contexto de que las neuronas poseen altos niveles de APP y, por ende, de βA_{1-42} (LeBlanc y col., 1991). Con estas condiciones experimentales, se ha determinado la expresión de proteínas "pro-vida", tales como ERK1/2 y CREB, cuya activación es dependiente de Ca^{2+} , tanto citosólico, como nuclear. ERK1/2 es una proteína implicada en la cascada de las MAPK¹³⁷, la cual regula procesos celulares, tales como la adhesión celular, la progresión del ciclo celular, la migración celular, la supervivencia celular, la diferenciación, el metabolismo, la proliferación y la transcripción. La activación de la cascada de las MAPK está mediada por señales de Ca^{2+} mediadas, por ejemplo por receptores de glutamato tipo NDMA o por los CCDV. Este Ca^{2+} activa a la GTPasa Ras o, gracias a la mediación de distintas cinasas; en cualquier caso, ERK1/2 se ve fosforilada, siendo ésta su forma activa, la cual se puede translocar al núcleo e inducir la transcripción génica, por ejemplo, activando por fosforilación al factor de transcripción CREB (Wiegert y Bading, 2011; Roskoski, 2012). CREB, por su parte, no solo es activado por ERK1/2, sino que para fosforilarse completamente debe haber grandes transientes de Ca^{2+} citosólicos. Finalmente, la forma activa de CREB induce la transcripción de genes implicados en la plasticidad sináptica y supervivencia celular, tales como c-fos o BDNF (Bito y Takemoto-Kimura, 2003; Wiegert y Bading, 2011). Pues bien, hemos demostrado que los oligómeros solubles del péptido βA_{1-42} en presencia de P86L-CALHM1 disminuyen la activación de estas proteínas "pro-vida", pues las formas activas de ERK1/2 y CREB se ven reducidas (Fig. 77); además, la cantidad total de CREB también disminuye, por lo que no es descabellado pensar que este

¹³⁷ MAPK: Del inglés mitogen-activated protein kinase, es decir, proteína cinasa activada por mitógenos

polimorfismo promueva una alteración en el reciclado y síntesis de las proteínas (conocido por el nombre inglés "turn-over") (Krebs y col., 2011; Stutzmann y Mattson, 2011), la cual puede ser debida a: i) el estrés reticular, que la expresión del canal produce (Gallego-Sandín y col., 2011); y ii) a la disminución de la entrada de Ca^{2+} tras la activación de P86L-CALHM1, comparada con la mediada por la forma nativa del canal (Dreses-Werringloer y col., 2008; Moreno-Ortega y col., 2010), que conlleva a una activación deficitaria de esta vía de señalización ERK1/2-CREB; esta última postulación ha sido relativamente descrita con anterioridad (aunque no referida a CALHM1), pues según Scott Bitner, el βA_{1-42} "per se" altera la homeostasia del Ca^{2+} a distintos niveles intracelulares, conllevando a un déficit en la activación de CREB y, por ende, a una disminución en la plasticidad sináptica (Scott Bitner, 2012).

Para determinar el efecto de la disminución de las proteínas "pro-vida" observado por nuestras condiciones experimentales (exposición de oligómeros solubles de βA_{1-42} en presencia de P86L-CALHM1), se ha estudiado muy detalladamente la vulnerabilidad celular.

Las células vulnerables degeneran mediante dos tipos básicos de muerte celular a saber, necrosis y apoptosis (Kepp y col., 2011). Mientras que la necrosis es un proceso incontrolado y violento, en el que la membrana plasmática se rompe, con la consecuente liberación al exterior de contenido citoplasmático (Lizarbe y col., 2007; Golstein y Kroemer, 2007), la apoptosis, o muerte celular programada, es un mecanismo de muerte muy regulado (Lizarbe y col., 2007; Hotchkiss y col., 2009), en el que las caspasas pro-apoptóticas juegan un papel fundamental, pues al escindir una gran variedad de sustratos, son responsables de los cambios bioquímicos y morfológicos ocurientes en la apoptosis (Slee y col., 2001); así, a modo de ejemplos, la translocación de la fosfatidilserina a la monocapa externa es un proceso dependiente, al menos parcialmente, de caspasas (Fadok y col., 1998), o la fragmentación del ADN está mediada por una desoxirribonucleasa dependiente de caspasa-3 (Enari y col., 1998). La importancia de estos mecanismos radica en el hecho de que la apoptosis puede ser modulable farmacológicamente.

Por otra parte, la expresión "per se" de CALHM1 o P86L-CALHM1 no resultó tóxica ni en las células HeLa (Fig. 65), ni en la línea HT22 (Fig. 73); estos resultados son acordes a lo ya descrito por el grupo de Marambaud (Dreses-Werringloer y col.,

2008). Sin embargo, la expresión de P86L-CALHM1, junto con el tratamiento prolongado de βA_{1-42} , promovió una disminución de viabilidad en las células HeLa (Figs. 68a y 69), que fue debida la activación de la apoptosis temprana y también de la necrosis (Fig. 71), mediadas por las caspasas 3 y 7 (Fig. 72). Además, el tratamiento crónico con βA alteró la homeostasia del Ca^{2+} celular en las células que expresan el canal, especialmente el mutado (Fig. 63).

Conviene destacar que en estas células HeLa, la vulnerabilidad hallada es significativa, pero ínfima, lo cual es relevante en el contexto de la EA, la cual es una patología de muy larga evolución: así, una pequeña vulnerabilidad celular mantenida en el tiempo puede ser responsable de diversos mecanismos de neurodegeneración. Por otra parte, también se aprecia que la apoptosis temprana también se activó en las células Control, aunque en menor medida; este hallazgo es comparable con lo mostrado por el grupo de Philippe Marambaud: la expresión y activación de CALHM1 reduce la liberación basal del βA de las células control y es por ello por lo que resulta protector, mientras que el polimorfismo P86L exacerba tal liberación (Dreses-Werringloer y col., 2008).

En cualquier caso, esta vulnerabilidad de las células frente al βA_{1-42} mediada por P86L-CALHM1 no fue un mecanismo dependiente del tipo celular, pues se ha comprobado que en un modelo neuronal de hipocampo de ratón también se activó la apoptosis temprana (Figs. 75 y 76). Por tanto, la alteración en la homeostasia del Ca^{2+} y en los niveles de βA mediada por P86L-CALHM1, disminuye la expresión de proteínas implicadas en la supervivencia celular, lo que hace a las células más vulnerables.

Probablemente, esta vulnerabilidad inducida por P86L-CALHM1 sea responsable de la relación de este polimorfismo con determinadas patologías neuronales, tales como la EA (Dreses-Werringloer y col., 2008), la epilepsia temporal lateral (Lv y col., 2011) y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (Calero y col., 2012). De hecho, se ha demostrado mediante un meta-análisis que los pacientes de EA esporádica que son homocigotos para P86L-CALHM1 tienden a ser más jóvenes, independientemente del género y del genotipo de APOE, de manera que P86L-CALHM1 acelera la patología de 5 a 10 años (Lambert y col., 2010). Sin embargo, el polimorfismo P86L-CALHM1 no es un factor genético determinante de la aparición de las patologías, se podría decir que es un co-adyuvante, que facilita la

progresión de las enfermedades; es por ello y por las grandes diferencias en los análisis estadísticos empleados por lo que numerosos autores rechazan el papel del polimorfismo P86L en la EA (Bertram y col., 2008; Feher y col., 2011; Inoue y col., 2009; Nacmias y col., 2010, entre otros). No obstante, el estudio de CALHM1 y sus polimorfismos continúa generando resultados interesantes, pues muy recientemente se han descrito otras variantes génicas implicadas en la EA, esta vez de aparición temprana; estos polimorfismos (R154H y G330D), al igual que P86L, reducen la permeabilidad del canal al Ca^{2+} e incrementan la vulnerabilidad celular frente al βA_{1-42} (Rubio-Moscardó y col., 2013).

Además, resulta harto interesante haber hallado que la combinación de la expresión de P86L-CALHM1 junto a la exposición del βA_{1-42} promueve la activación de la muerte celular programada, ya que ésta se encuentra exacerbada en los cerebros de pacientes de EA (Ribe y col., 2008; Crews y Masliah, 2010). Por ejemplo, las neuronas piramidales de las regiones más afectadas en la EA presentan niveles muy elevados de las caspasas 3 y 6 activas (LeBlanc y col., 1999; Stadelmann y col., 1999). Por tanto, la neurodegeneración apoptótica observada en la EA, que primeramente afecta a las neuronas colinérgicas, es pareja al efecto del βA_{1-42} en las células HT22 que expresan P86L-CALHM1. Estas condiciones experimentales que provocan una alteración en las señales de Ca^{2+} (Fig. 63), una disminución en las proteínas "pro-vida" (Fig. 77) y una activación de las caspasas ejecutoras (Fig.72) promueven una señal lenta de muerte celular (Figs.71 y 76), que podrían considerarse como un nuevo modelo para estudiar el proceso neurodegenerativo ocuriente en la EA.

Una de las dificultades que presenta el estudio del papel fisiológico de CALHM1 es la carencia de moduladores farmacológicos. Hasta la fecha, se han empleado únicamente bloqueantes inespecíficos de canales de Ca^{2+} a muy altas concentraciones (Ma y col., 2012; Siebert y col., 2013; Dreses-Werringloer y col., 2008; Dreses-Werringloer y col., 2013). En este Trabajo hemos tratado de hallar un modulador, tanto del canal nativo, para usarlo como herramienta farmacológica y nos permita discernir el papel de CALHM1, como del canal mutado P86L, con la intención de atenuar el efecto de la mutación.

En un primer momento, se utilizó el Co^{2+} , como control positivo de bloqueo, con el fin de determinar que en nuestras condiciones experimentales, el canal se bloqueaba, y así ocurría (Fig. 51).

Posteriormente, se pretendió determinar si guardaba alguna relación con los elementos responsables de la entrada capacitativa de Ca^{2+} , para lo que se usó un bloqueante de la misma, el fluconazol (Villalobos y col., 1992). Sin embargo, este imidazol no moduló al canal (Fig. 52), por lo que CALHM1 induce una señal de Ca^{2+} funcionalmente distinta a la entrada capacitativa de Ca^{2+} .

Después, se utilizó el ITH12233/IQM9.21 un compuesto que, pese a bloquear las corrientes de Ca^{2+} de manera un tanto inespecífica (Maroto y col., 2011), era sumamente interesante, debido a su perfil neuroprotector frente a estímulos tóxicos de índole diversa (sobrecarga de Ca^{2+} , estrés oxidativo, isquemia y reperusión, βA ... (Arce y col., 2009; Lorrio y col., 2013)). Analizando los parámetros cinéticos de la señal de Ca^{2+} en presencia del fármaco se puede apreciar que, aunque de forma no significativa, el compuesto ITH12233/IQM9.21 a una concentración de 1 μM tiende, claramente a bloquear de manera selectiva al canal nativo (Fig. 54); quizás, este compuesto debería haberse dejado incubando unos minutos más antes del protocolo de reintroducción de Ca^{2+} , pues según observaciones de otros investigadores, es precisa una pre-incubación prolongada para que el compuesto se inserte en las membranas, o las module.

Más tarde, se utilizaron fármacos moduladores de la homeostasia del Ca^{2+} mitocondrial. Se comenzó con la dimebona, que parecía haber tenido unos espectaculares resultados en un ensayo clínico (Bachurin y col., 2003), aunque no pudieron ser nunca replicados (Cano-Cuenca y col., 2014). En cualquier caso, la dimebona ejerce un efecto directo sobre la mitocondria, pues bloquea la apertura del mPTP mediada por el βA (Fig. 55). Sin embargo, el tratamiento de la dimebona, aun en concentraciones elevadas, no moduló farmacológicamente al canal CALHM1 ni a su polimorfismo P86L (Fig. 56).

Posteriormente, se utilizó el CGP37157, pues aunque se ha venido utilizando como bloqueante del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial, CGP37157 (Hernández-SanMiguel y col., 2006), se trata de un fármaco neuroprotector frente a diversos estímulos tóxicos (sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} , excitotoxicidad por glutamato o privación de oxígeno y glucosa...); ello es debido, a que, por una parte, modula la

homeostasia del Ca^{2+} mitocondrial y, por otra parte, bloquea inespecíficamente diversos canales de Ca^{2+} y Na^{+} (Nicolau y col., 2009, Nicolau y col., 2010; González-Lafuente y col., 2012, Ruiz y col., 2014). En este Trabajo, acabamos de descubrir el primer compuesto orgánico capaz de modular, a bajas concentraciones y de manera selectiva, la señal de Ca^{2+} mediada por CALHM1: a una concentración de 1 μM , el CGP37157 bloqueó en un 35-40 % la señal mediada por el canal nativo (tanto el pico máximo de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ como el Ca^{2+} total por unidad de tiempo), permaneciendo la forma mutada P86L inalterada (Fig. 57). Además, el tratamiento crónico con este fármaco no indujo cambio morfológico alguno en las células, ni toxicidad (Fig. 58). Por tanto, este compuesto se configuró como un cabeza de serie en el que trabajar, para poder hallar un bloqueante de CALHM1 más potente. De hecho, se empleó un derivado isopropílico, el ITH12757, más polar, más afin al mNCX y con similar perfil neuroprotector; sin embargo, el cabeza de serie fue más eficaz, pues el racémico de ITH12757, a la misma concentración que el CGP37157 no moduló el canal; únicamente el enantiómero S resultó tener una cierta actividad bloqueante, siempre menor que la del cabeza de serie (Fig. 60). Sin embargo, dado que el CGP37157 bloqueaba simultáneamente CALHM1 y mNCX, cabía la posibilidad de que el bloqueo de CALHM1 fuera secundario al del mNCX, mediado por el Ca^{2+} que la mitocondria no puede tamponar en caso de bloqueo absoluto del mNCX; para descartar tal posibilidad, se abolió la capacidad tamponadora de Ca^{2+} de la mitocondria, mediante el empleo del protonóforo FCCP, y se observó que el bloqueo de CALHM1 por el CGP37157 es independiente del efecto que tiene sobre el mNCX (Fig. 58). Por tanto, el CGP37157 es el primer compuesto orgánico que bloquea a concentraciones muy bajas y de manera muy selectiva al canal CALHM1. Sin embargo, hemos fracasado en el intento de hallar un modulador de P86L-CALHM1.

El empleo de estas herramientas farmacológicas, nos permite estudiar el papel fisiológico este canal de Ca^{2+} tan elusivo.

Por una parte, se ha postulado que CALHM1 se encuentra regulando la excitabilidad de la membrana, pues las neuronas del ratón nulo para CALHM1 presentan una excitabilidad menor y las respuestas a distintos estímulos de corrientes son tónicas en vez de fásicas (Fig. 15; Ma y col., 2012). Aunque los ratones nulos son viables y sanos, se ha advertido en *C. elegans* que la delección del homólogo CHLM-1 altera la

neurotransmisión que regula la locomoción, de manera que los nematodos nulos presentan una locomoción descoordinada (Tanis y col., 2013).

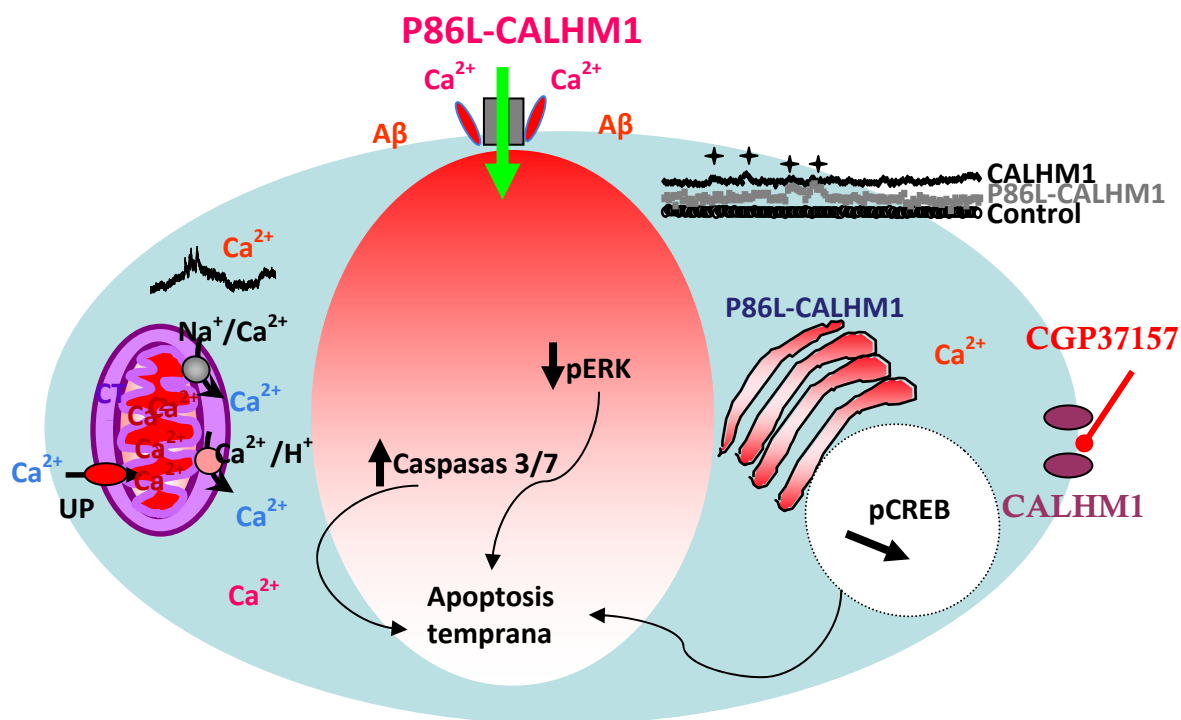
Por otra parte, la señal de Ca^{2+} mediada por CALHM1 activa la señalización de las MAPKs. Sin embargo, se desconoce el significado fisiológico de esta activación (Siebert y col., 2013).

Finalmente, a raíz de la generación del ratón nulo, se descubrió un papel fisiológico de CALHM1: la transducción del gusto. Curioso debió de ser tal descubrimiento, al advertir que los ratones nulos para CALHM1 no mostraban preferencias ni aversiones gustativas ante la presentación de compuestos dulces, amargos o umamis (Taruno y col., 2013a) y, posteriormente, muy salados (Tordoff y col., 2014). Sin embargo, las curiosidades en ciencia pocas veces ocurren: en 2009, el grupo de Albert Zlotnik publicó un artículo que ha pasado prácticamente inadvertido. En él se describe que, tanto en ratón, como en macaco y en humano, CALHM1 se encuentra expresado en las papilas gustativas positivas para TRPM5, las cuales se encargan de la transducción de los sabores dulce, amargo y umami; dicha transducción es dependiente de Ca^{2+} (Moyer y col., 2009) y el neurotransmisor implicado es el ATP (Finger y col., 2005). CALHM1 se expresa en las papilas gustativas tipo II de los ratones, encargadas de la transducción de mencionados sabores. Tras la llegada de la molécula saborizante, CALHM1 se encuentra mediando la liberación de ATP que excita a la neurona aferente, purinérgica (Fig. 15). Sin embargo, se desconoce el efecto que P86L-CALHM1 pueda tener en este contexto, aunque no es deleznable el hecho de que los pacientes de las patologías para las que P86L-CALHM1 incrementa la vulnerabilidad, como la EA, y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, presentan alteraciones en el olfato y en el gusto (Steinbach y col., 2010; Aliani y col., 2013; Ansoleaga y col., 2013); sería interesante, pues, genotipar a estos pacientes con la quimiocepción defectuosa y determinar si estas alteraciones que, en numerosas ocasiones aparecen premórbidamente, se correlacionan con la expresión del polimorfismo P86L, de manera que pudieran ser utilizados ambos factores (disgeusia y P86L-CALHM1) como biomarcadores de neurodegeneración.

Por tanto, CALHM1 es un canal de Ca^{2+} implicado en la excitabilidad neuronal y en la transducción del gusto, que media señales de Ca^{2+} patentes en distintas organelas y es bloqueado selectivamente por CGP37157. Por su parte, P86L-CALHM1 altera la homeostasia del Ca^{2+} , disminuyendo la expresión de proteínas

"pro-vida" dependientes de Ca^{2+} e incrementando la vulnerabilidad celular ante estímulos tóxicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer.

Para finalizar, se esquematizan los principales hallazgos obtenidos en la presente Trabajo de Investigación: por una parte, CGP37157 es un bloqueante de CALHM1; por otra parte, P86L-CALHM1 promueve la toxicidad del βA alterando la homeostasia del Ca^{2+} intracelular, disminuyendo los niveles de proteínas "pro-vida" e iniciando la muerte celular apoptótica.



10. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

10. CONCLUSIONES

- ✓ En los modelos celulares empleados, HeLa, SH-SY5Y y HT22, CALHM1 y su polimorfismo P86L-CALHM1, se expresan, de forma transitoria, en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico.
- ✓ La activación de CALHM1, mediante un protocolo de reintroducción de Ca^{2+} , induce un claro incremento en la concentración de Ca^{2+} del citosol, la mitocondria y el núcleo. Sin embargo, P86L-CALHM1 origina una señal de Ca^{2+} menor y mantenida en el tiempo, en forma de meseta.
- ✓ La expresión de CALHM1 y P86L-CALHM1 reduce el contenido de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico.
- ✓ Hemos descubierto el primer compuesto orgánico capaz de modular de manera selectiva a CALHM1 a concentraciones micromolares: el CGP37157.
- ✓ La expresión de P86L-CALHM1 provoca en las células una mayor vulnerabilidad hacia estímulos tóxicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer, como los oligómeros solubles del péptido β -amiloide₁₋₄₂. El mecanismo de vulnerabilidad es debido a la reducción de proteínas "pro-vida", tales como ERK1/2 o CREB, y a la inducción de la muerte celular apoptótica.

10. CONCLUSIONS

- ✓ CALHM1 and its polymorphism P86L are expressed in the plasma membrane and in the endoplasmic reticulum of HeLa, SH-SY5Y and HT22 cells.
- ✓ CALHM1, when activated by an add-back Ca^{2+} protocol, induces a patent Ca^{2+} increase in the cytosol, mitochondria and nucleus. However, P86L-CALHM1 causes a Ca^{2+} signal that is smaller and remains longer in a plateau.
- ✓ Expression of CALHM1 and P86L-CALHM1 reduce the Ca^{2+} content in the endoplasmic reticulum.
- ✓ We have discovered the first organic compound able to selectively block CALHM1 at low micromolar concentrations: i.e. CGP37157.
- ✓ The expression of P86L-CALHM1 renders more vulnerability to cells, specifically towards Alzheimer's disease-related insults, such as amyloid β . The mechanism of vulnerability is due to the reduction of "pro-survival" proteins, such as ERK1/2 and CREB and to trigger cell death by the apoptotic pathway.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, M.F., Di Benedetto, G., Magalhães, P.J., Filippin, L. y Pozzan, T. (2004): "Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant", *J. Biol. Chem.*, 279(12), pp.11521-11529. PMID: 14701849
- Abramov, A.Y. y Duchen, M.R. (2005): "The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides", *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.*, 360(1464), pp.2309-2314. PMID: 16321801
- Adey, A., Burton, J.N., Kitzman, J.O., Hiatt, J.B., Lewis, A.P., Martin, B.K., Qiu, R., Lee, C. y Shendure, J. (2013): "The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line", *Nature*, 500(7461), pp.207-211. PMID: 23925245. doi: 10.1038/nature12064
- Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M.F., Cavaliere, F., Pérez-Samartín, A., Zugaza, J.L., Trullas, R., Domercq, M. y Matute, C. (2010): "Amyloid β oligomers induce Ca^{2+} dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors", *Cell Calcium*, 47(3), pp.264-272. PMID: 20061018. doi: 10.1016/j.ceca.2009.12.010
- Alexander, M., Patil, A.K., Mathew, V., Sivadasan, A., Chacko, G. y Mani, S.E. (2013): "Recurrent craniospinal subarachnoid hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy", *Ann. Indian Acad. Neurol.*, 16(1), pp.97-99. PMID: 23661974. doi: 10.4103/0972-2327.107712
- Aliani, M., Udenigwe, C.C., Girgih, A.T., Pownall, T.L., Bugera, J.L. y Eskin, M.N. (2013): "Aroma and taste perceptions with Alzheimer disease and stroke", *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 53(7), pp.760-769. PMID: 23638935. doi: 10.1080/10408398.2011.559557
- Allbritton, N.L., Oancea, E., Kuhn, M.A. y Meyer, T. (1994): "Source of nuclear calcium signals", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91(26), pp.12458-12462. PMID: 7809059
- Alonso, A.C., Grundke-Iqbal, I. e Iqbal, K. (1996): "Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules", *Nat. Med.*, 2(7), pp.783-787. PMID: 8673924
- Alonso, M.T. y García-Sancho, J. (2011): "Nuclear Ca^{2+} signalling", *Cell Calcium*, 49(5), pp.280-289. PMID: 21146212 doi: 10.1016/j.ceca.2010.11.004
- Alonso-Vilatela, M.E., López-López, M. y Yescas-Gómez, P. (2012): "Genetics of Alzheimer's disease", *Arch. Med. Res.*, 43(8), pp.622-631. PMID: 23142261. doi: 10.1016/j.arcmed.2012.10.017
- Alsop, D.C., Detre, J.A. y Grossman, M. (2000): "Assessment of cerebral blood flow in Alzheimer's disease by spin-labeled magnetic resonance imaging", *Ann. Neurol.*, 47(1), pp.93-100. PMID: 10632106
- Alzheimer, A. (1907): "Über einen eigenartige Erkrankung der Hirnrinde", *Allemaigne Zeitschrift für Psychiatrie*, 64, pp.146-148

- Ansoleaga, B., García-Esparcia, P., Llorens, F., Moreno, J., Aso, E. y Ferrer, I. (2013): "Dysregulation of brain olfactory and taste receptors in AD, PSP and CJD, and AD-related model", *Neuroscience*, 248, pp.369-382. PMID: 23817016. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.034
- Aqdam, M.J., Kamali, K., Rahgozar, M., Ohadi, M., Manoochehri, M., Tahami, A., Bostanshirin, L. y Khorshid, H.R. (2010): "Association of CALHM1 gene polymorphism with late onset Alzheimer's disease in Iranian population", *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, 2(3), pp.153-157. PMID: 23408664
- Arce, M.P., Rodríguez-Franco, M.I., González-Muñoz, G.C., Pérez, C., López, B., Villarroja, M., López, M.G., García, A.G. y Conde, S. (2009): "Neuroprotective and cholinergic properties of multifunctional glutamic acid derivatives for the treatment of Alzheimer's disease", *J. Med. Chem.*, 52(22), pp.7249-7257. PMID: 19856923. doi: 10.1021/jm900628z
- Arispe, N., Díaz, J.C. y Simakova, O. (2007): "A β ion channels. Prospects for treating Alzheimer's disease with A β channel blockers", *Biochim. Biophys. Acta*, 1768(8), pp.1952-1965. PMID: 17490607
- Armstrong, R.A. (2013): "What causes Alzheimer's disease?", *Folia Neuropathol.*, 51(3), pp.169-188. PMID: 24114635
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T. y Hyman, B.T. (1992): "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease", *Neurology*, 42(Pt 1), pp.631-639. PMID: 1549228
- Bachs, O., Agell, N. y Carafoli, E. (1992): "Calcium and calmodulin function in the cell nucleus", *Biochim Biophys Acta*, 1113(2), pp.259-270. PMID: 1510999
- Bachurin, S., Bukatina, E., Lermontova, N., Tkachenko, S., Afanasiev, A., Grigoriev, V., Grigorieva, I., Ivanov, Y., Sablin, S. y Zefirov, N. (2001): "Antihistamine agent Dimebon as a novel neuroprotector and a cognition enhancer", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 939, pp.425-435. PMID: 11462798
- Bachurin, S.O., Shevtsova, E.P., Kireeva, E.G., Oxenkrug, G.F. y Sablin, S.O. (2003): "Mitochondria as a target for neurotoxins and neuroprotective agents", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 993, pp.334-344; discusión en 345-349. PMID: 12853325
- Badminton, M.N., Campbell, A.K. y Rembold, C.M. (1996): "Differential regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺ in HeLa cells", *J. Biol. Chem.*, 271(49), pp.31210-31214. PMID: 8940122
- Banzhaf-Strathmann, J., Benito, E., May, S., Arzberger, T., Tahirovic, S., Kretzschmar, H., Fischer, A. y Edbauer, D. (2014): "MicroRNA-125b induces tau hyperphosphorylation and cognitive deficits in Alzheimer's disease", *EMBO J.*, 33(15), pp.1667-1680. PMID: 25001178. doi: 10.15252/emj.201387576
- Barnes, L.L., Capuano, A.W., Aiello, A.E., Turner, A.D., Yolken, R.H., Torrey, E.F., Bennett, D.A. (2014): "Cytomegalovirus Infection and Risk of Alzheimer Disease in Older Black and White Individuals", *J. Infect. Dis.*, (en prensa). PMID: 25108028

- Bartel, D.P. (2004): "MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function", *Cell*, 116(2), pp.281-297. PMID: 14744438
- Beecham, G.W., Schnetz-Boutaud, N., Haines, J.L. y Pericak-Vance, M.A. (2009): "CALHM1 polymorphism is not associated with late-onset Alzheimer disease", *Ann. Hum. Genet.*, 73(Pt 3), pp.379-381. PMID: 19472444
- Behl, C., Widmann, M., Trapp, T. y Holsboer, F. (1995): "17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 216(2), pp.473-482. PMID: 7488136
- Bell, R.D., Sagare, A.P., Friedman y col., Bedi, G.S., Holtzman, D.M., Deane, R., Zlokovic, B.V. (2007): "Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid β -peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central system", *J. Cer. Blood Flow Metab.*, 27(5), pp.909-918. PMID: 17077814
- Bennett, D.L., Cheek, T.R., Berridge, M.J., De Smedt, H., Parys, J.B., Missiaen, L. y Bootman, M.D. (1996): "Expression and function of ryanodine receptors in nonexcitable cells", *J. Biol. Chem.*, 271(11), pp.6356-6362. PMID: 8626432
- Berridge, M.J. (2010): "Calcium hypothesis of Alzheimer's disease", *Pflugers Arch.*, 459(3), pp.441-449. PMID: 19795132. doi: 10.1007/s00424-009-0736-1
- Berridge, M.J. (2011): "Calcium signalling and Alzheimer's disease", *Neurochem. Res.*, 36(7), pp.1149-1156. PMID: 21184278. doi: 10.1007/s11064-010-0371-4
- Berridge, M.J. (2012): "Calcium signalling remodelling and disease", *Biochem. Soc. Trans.*, 40(2), pp.297-309. PMID: 22435804. doi: 10.1042/BST20110766
- Berridge, M.J. (2013): "Dysregulation of neural calcium signaling in Alzheimer disease, bipolar disorder and schizophrenia", *Prion*, 7(1), pp.2-13. PMID: 22895098. doi: 10.4161/pri.21767
- Berridge, M.J. (2014): "Calcium regulation of neural rhythms, memory and Alzheimer's disease", *J. Physiol.*, 592(Pt 2), pp.281-293. PMID: 23753528. doi: 10.1113/jphysiol.2013.257527
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. y Roderick, H.L. (2013): "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling", *Nat. Rev. Mol Cell Biol.*, 4(7), pp.517-529. PMID: 12838335
- Bertram, L., Schjeide, B.M., Hooli, B., Mullin, K., Hiltunen, M., Soininen, H., Ingelsson, M., Lannfelt, L., Blacker, D. y Tanzi, R.E. (2008): "No association between CALHM1 and Alzheimer's disease risk", *Cell*, 135(6), pp.993-994; author reply pp.994-996. PMID: 19070563. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.030
- Bezprozvanny, I. y Mattson, M.P. (2008): "Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease", *Trends Neurosci.*, 31(9), pp.454-463. PMID: 18675468. doi: 10.1016/j.tins.2008.06.005
- Bharadwaj, P.R., Bates, K.A., Porter, T., Teimouri, E., Perry, G., Steele, J.W., Gandy, S., Groth, D., Martins, R.N. y Verdile, G. (2013): "Latrepirdine: molecular mechanisms underlying potential therapeutic roles in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases", *Transl. Psychiatry*, 3, e332. PMID: 24301650. doi: 10.1038/tp.2013.97.

- Biedler, J.L., Helson, L. y Spengler, B.A. (1973): "Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture", *Cancer Res.*, 33(11), pp.2643-2652. PMID: 4748425
- Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. y Freedman, L.S. (1978): "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones", *Cancer Res.*, 38(11 Pt 1), pp.3751-3757. PMID: 29704
- Bien-Ly, N., Andrews-Zwilling, Y., Xu, Q., Bernardo, A., Wang, C. y Huang, Y. (2011): "C-terminal-truncated apolipoprotein (apo) E4 inefficiently clears amyloid- β ($A\beta$) and acts in concert with $A\beta$ to elicit neuronal and behavioral deficits in mice", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(10), pp.4236-4241. PMID: 21368138. doi: 10.1073/pnas.1018381108
- Bierer, L.M., Hof, P.R., Purohit, D.P., Carlin, L., Schneider, J., Davis, K.L. y Perl, D.P. (1995): "Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease", *Arch. Neurol.*, 52(1), pp.81-88. PMID: 7826280
- Biswas, S. C., Shi, Y., Vonsattel, J. P., Leung, C. L., Troy, C. M. y Greene, L. A. (2007): "Bim is elevated in Alzheimer's disease neurons and is required for β -amyloid-induced neuronal apoptosis", *J. Neurosci.*, 27(4): 893-900. PMID: 17251431
- Bito, H. y Takemoto-Kimura, S. (2003): "Ca(2+)/CREB/CBP-dependent gene regulation: a shared mechanism critical in long-term synaptic plasticity and neuronal survival", *Cell Calcium*, 34(4-5), pp.425-430
- Blazejczyk, M., Wojda, U., Sobczak, A., Spilker, C., Bernstein, H. G., Gundelfinger, E. D., Kreutz, M. R. y Kuznicki, J. (2006): "Ca²⁺-independent binding and cellular expression profiles question a significant role of calmyrin in transduction of Ca²⁺ - signals to Alzheimer's disease-related presenilin 2 in forebrain", *Biochim. Biophys. Acta*, 1762(1), pp.66-72. PMID: 16257512
- Boada, M., Antúnez, C., López-Arrieta, J., Galán, J.J., Morón, F.J., Hernández, I., Marín, J., Martínez-Lage, P., Alegret, M., Carrasco, J.M., Moreno, C., Real, L.M., González-Pérez, A., Tárraga, L. y Ruiz, A. (2010): "CALHM1 P86L polymorphism is associated with late-onset Alzheimer's disease in a recessive model", *J. Alzheimers Dis.*, 20(1), pp.247-251. PMID: 20164592. doi: 10.3233/JAD-2010-1357
- Bonora, M., Giorgi, C., Bononi, A., Marchi, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Rizzuto, R. y Pinton, P. (2013): "Subcellular calcium measurements in mammalian cells using jellyfish photoprotein aequorin-based probes", *Nat. Protoc.*, 8(11), pp.2105-2118. PMID: 24113784. doi: 10.1038/nprot.2013.127
- Bootman, M.D., Fearnley, C., Smyrnias, I., MacDonald, F., Roderick, H.L. (2009): "An update on nuclear calcium signalling", *J. Cell Sci.*, 122(Pt 14), pp.2337-2350. PMID: 19571113. doi: 10.1242/jcs.028100
- Bozzali, M., Dowling, C., Serra, L., Spanò, B., Torso, M., Marra, C., Castelli, D., Dowell, N.G., Koch, G., Caltagirone, C y Cercignani, M. (2014): "The impact of cognitive reserve on brain functional connectivity in Alzheimer's disease", *J. Alzheimers Dis.*, (en prensa). PMID: 25201783
- Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A. y Henson, P.M. (1997): "Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-

- mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase", *J. Biol. Chem.*, 272(42), pp.26159-26165. PMID: 9334182
- Braak, H. y Braak, E. (1991): "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes", *Acta Neuropathol.*, 82(4), pp.239-259. PMID: 1759558
- Brimson, J.M., Brimson, S.J., Brimson, C.A., Rakkhitawatthana, V. y Tencomnao, T. (2012): "Rhinacanthus nasutus extracts prevent glutamate and amyloid- β neurotoxicity in HT-22 mouse hippocampal cells: Possible active compounds include Lupeol, Stigmasterol and β -Sitosterol", *Int. J. Mol. Sci.*, 13(4), pp.5074-5097. PMID: 22606031. doi: 10.3390/ijms13045074
- Brini, M., Marsault, R., Bastianutto, C., Pozzan, T. y Rizzuto, R. (1994a): "Nuclear targeting of aequorin. A new approach for measuring nuclear Ca^{2+} concentration in intact cells", *Cell Calcium*, 16(4): 259-268.
- Brini, M., Pasti, L., Bastianutto, C., Murgia, M., Pozzan, T. y Rizzuto, R. (1994b): "Targeting of aequorin for calcium monitoring in intracellular compartments", *J. Biolumin. Chemilumin.*, 9(3), pp.177-184. PMID: 7942123
- Brini, M., Marsault, R., Bastianutto, C., Álvarez, J., Pozzan, T. y Rizzuto, R. (1995): "Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). A critical evaluation", *J. Biol. Chem.*, 270(17), pp.9896-9903. PMID: 7730373
- Brini, M., Pinton, P., Pozzan, T. y Rizzuto, R. (1999): "Targeted recombinant aequorins: tools for monitoring $[\text{Ca}^{2+}]$ in the various compartments of a living cell", *Microsc. Res. Tech.*, 46(6), pp.380-389. PMID: 10504215
- Brown, N.A., Kemp, J.A. y Seabrook, G.R. (1994): "Block of human voltage-sensitive Na^+ currents in differentiated SH-SY5Y cells by lifarizine", *Br. J. Pharmacol.*, 113(2), pp.600-606. PMID: 7834213
- Bu, X.L., Yao, X.Q., Jiao, S.S., Zeng, F., Liu, Y.H., Xiang, Y., Liang, C.R., Wang, Q.H., Wang, X., Cao, H.Y., Yi, X., Deng, B., Liu, C.H., Xu, J., Zhang, L.L., Gao, C.Y., Xu, Z.Q., Zhang, M., Wang, L., Tan, X.L., Xu, X., Zhou, H.D., Wang, Y.J. (2014): "A study on the association between infectious burden and Alzheimer's disease", *Eur. J. Neurol.*, (en prensa). PMID: 24910016. doi: 10.1111/ene.12477
- Budde, T., Meuth, S. y Pape, H.C. (2002): "Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels", *Nat. Rev. Neurosci.*, 3(11), pp.873-883. PMID: 12415295
- Buerger, K., Ewers, M., Pirttilä, T., Zinkowski, R., Alafuzoff, I., Teipel, S.J., DeBernardis, J., Kerkman, D., McCulloch, C., Soininen, H. y Hampel, H. (2006): "CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease", *Brain*, 129(Pt 11): 3035-3041. PMID: 17012293
- Burgo, A., Carmignoto, G., Pizzo, P., Pozzan, T. y Fasolato, C. (2003): "Paradoxical Ca^{2+} rises induced by low external Ca^{2+} in rat hippocampal neurones", *J. Physiol.*, 549(Pt 2), pp.537-552. PMID: 12692181
- Bush, A.I., Pettingell, Jr. W.H., Paradis, M.D. y Tanzi, R.E. (1994): "Modulation of $\text{A}\beta$ adhesiveness and secretase site cleavage by zinc", *J. Biol. Chem.*, 269(16), pp.12152-12158. PMID: 8163520

- Bush, A. I. (2003): "The metallobiology of Alzheimer's disease", *Trends Neurosci.*, 26(4), pp.207-214. PMID: 12689772
- Butterfield, D. A., Castegna, A., Lauderback, C. M., y Drake, J. (2002): "Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death", *Neurobiol. Aging*, 23(5): 655-664. PMID: 12392766
- Calero, O., Bullido, M.J., Clarimón, J., Hortigüela, R., Frank-García, A., Martínez-Martín, P., Lleó, A., Rey, M.J., Sastre, I., Rábano, A. de Pedro-Cuesta, J., Ferrer, I. y Calero, M. (2012): "Genetic variability of the gene cluster CALHM 1-3 in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease", *Prion*, 6(4), pp.407-412. PMID: 22874670. doi: 10.4161/pri.20785
- Calkins, M.J. y Reddy, P.H. (2011): "Amyloid beta impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's disease neurons", *Biochim. Biophys. Acta*, 1812(4): 507-513. PMID: 21241801. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.01.007
- Callaway, E. (2013): "Deal done over HeLa cell line", *Nature*, 500(7461), pp.132-133. PMID: 23925220. doi: 10.1038/500132a
- Callaway, E. (2014): "Contamination hits cell work", *Nature*, 511(7511), p.518. PMID: 25079533. doi: 10.1038/511518a
- Camandola, S. y Mattson, M.P. (2011): "Aberrant subcellular neuronal calcium regulation in aging and Alzheimer's disease", *Biochim. Biophys. Acta*, 1813(5), pp.965-973. PMID: 20950656. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.10.005
- Cano-Cuenca, N., Solís-García del Pozo, J.E. y Jordán, J. (2014): "Evidence for the efficacy of latrepirdine (Dimebon) treatment for improvement of cognitive function: a meta-analysis", *J. Alzheimers Dis.*, 38(1), pp.155-164. PMID: 23948924. doi: 10.3233/JAD-130872
- Carbone, I., Lazzarotto, T., Ianni, M., Porcellini, E., Forti, P., Masliah, E., Gabrielli, L. y Licastro, F. (2014): "Herpes virus in Alzheimer's disease: relation to progression of the disease", *Neurobiol. Aging*, 35(1), pp.122-129. PMID: 23916950. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.024
- Castellani, R.J., Rolston, R.K. y Smith, M.A. (2010): "Alzheimer Disease", *Dis. Mon.*, 56(9), pp.484-546. PMID: 20831921. doi: 10.1016/j.disamonth.2010.06.001
- Celsi, F., Pizzo, P., Brini, M., Leo, S., Fotino, C., Pinton, P. y Rizzuto, R. (2009): "Mitochondria, calcium and cell death: A deadly triad in neurodegeneration", *Biochim. Biophys. Acta*, 1787(5), pp. 335-344. PMID: 19268425. doi: 10.1016/j.bbabbio.2009.02.021
- Cha, M.Y., Han, S.H., Son, S.M., Hong, H.S., Choi, Y.J., Byun, J. y Mook-Jung, I. (2012): "Mitochondria-specific accumulation of amyloid β induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death", *PloS One*, 7(4):e34929. PMID: 22514691. doi: 10.1371/journal.pone.0034929
- Chamero P., Manjarres, I.M., García-Verdugo, J.M., Villalobos, C., Alonso, M.T. y García-Sancho, J. (2008): "Nuclear calcium signaling by inositol trisphosphate in GH3 pituitary cells", *Cell Calcium*, 43(2), pp.205-214. PMID: 17583789

- Chen, J., Small-Howard, A., Yin, A. y Berry, M.J. (2005): "The responses of Ht22 cells to oxidative stress induced by buthionine sulfoximine (BSO)", *BMC Neurosci.*, 6, p.10. PMID: 15707499
- Chen, H., y Chan, D.C. (2009): "Mitochondrial dynamics - fusion, fission, movement, and mitophagy - in neurodegenerative diseases", *Hum. Mol. Genet.*, 18: R169-R176. PMID: 19808793. doi: 10.1093/hmg/ddp326
- Chen, Q.S., Kagan, B.L., Hirahura, Y. y Xie, C.W. (2000): "Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid β peptides", *J. Neurosci. Res.*, 60, pp.65-72. PMID: 10723069
- Chin, J.H., Ma, L., MacTavish, D. y Jhamandas, J.H. (2007): "Amyloid β protein modulates glutamate-mediated neurotransmission in the rat basal forebrain: involvement of presynaptic neuronal nicotinic acetylcholine and metabotropic glutamate receptors", *J. Neurosci.*, 27(35), pp.9262-9269. PMID: 17728440
- Citron, M., Westaway, D., Xia. W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P. y Selkoe, D.J. (1997): "Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid β -protein in both transfected cells and transgenic mice", *Nat. Med.*, 3(1), pp.67-72. PMID: 8986743
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A. (1993): "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families", *Science*, 261(5123), pp.921-923. PMID: 8346443
- Correia, S.C., Santas, R.X., Cardoso, S., Carvalho, C., Candeias, E., Duarte, A.I., Plácido, A.I., Santos, M.S. y Moreira, P.I. (2012): "Alzheimer disease as a vascular disorder: Where do mitochondria fit?", *Exper. Gerontol.*, 47(11), pp.878-886. PMID: 22824543. doi: 10.1016/j.exger.2012.07.006
- Craft, J.M., Watterson, D.M. y Van Eldik, L.J., (2006): "Human amyloid beta-induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration", *Glia*, 53(5), pp.484-490. PMID: 16369931
- Craft, S. (2007): "Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment", *Curr. Alzheimer Res.*, 4(2), pp.147-152. PMID: 17430239
- Crews, L. y Masliah, E. (2010): "Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease", *Hum. Mol. Gen.*, 19(R1), pp.R12-R20. PMID: 20413653. doi: 10.1093/hmg/ddq160
- Cruts, M. y Van Broeckhoven, C. (1998): "Molecular genetics of Alzheimer's disease", *Annals Med.*, 30(6), pp.560-565. PMID: 9920359
- Cui, P.J., Zheng, L., Cao, L., Wang, Y., Deng, Y.L., Wang, G., Xu, W., Tang, H.D., Ma, J.F., Zhang, T., Ding, J.Q., Cheng, Q. y Chen, SD (2010): "CALHM1 P86L polymorphism is a risk factor for Alzheimer's disease in the Chinese population", *J. Alzheimers Dis.*, 19(1), pp.31-35. PMID: 20061624. doi: 10.3233/JAD-2010-1207

- Cumming, R.D. y Schubert, D. (2005): "Amyloid-beta induces disulfide bonding and aggregation of GAPDH in Alzheimer's disease", *FASEB J.*, 19(14), pp.2060-2062. PMID: 16186172
- Davis, J.B. y Maher, P. (1994): "Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line", *Brain Res.*, 652(1), pp.169-173. PMID: 7953717
- Davies P. y Maloney, A.J. (1976): "Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease", *Lancet*, 2(8000), p.1403. PMID: 63862
- De Jager, P.L., Srivastava, G., Lunnon, K., Burgess, J., Schalkwyk, L.C., Yu, L., Eaton, M.L., Keenan, B.T., Ernst, J., McCabe, C., Tang, A., Raj, T., Replogle, J., Brodeur, W., Gabriel, S., Chai, H.S., Younkin, C., Younkin, S.G., Zou, F., Szyf, M., Epstein, C.B., Schneider, J.A., Bernstein, B.E., Meissner, A., Ertekin-Taner, N., Chibnik, L.B., Kellis, M., Mill, J. y Bennett, D.A. (2014): "Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci", *Nat. Neurosci.*, 17(9), pp.1156-1163. PMID: 25129075. doi:10.1038/nn.3786
- De La Monte, S.M. y Wands, J.R. (2006): "Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease", *J. Alzheimers Dis.*, 9(2), pp.167-181. PMID: 16873964
- Deecher, D.C., Daoud, P., Bhat, R.A. y O'Connor, L.T. (2005): "Endogenously expressed estrogen receptors mediate neuroprotection in hippocampal cells (HT22)", *J. Cell Biochem.*, 95(2), pp.302-312. PMID: 15778979
- Demuro, A., Smith, M. y Parker, I. (2011): "Single-channel Ca^{2+} imaging implicates $A\beta_{1-42}$ amyloid pores in Alzheimer's disease pathology", *J. Cell Biol.*, 195(3), pp.515-524. PMID: 22024165. doi: 10.1083/jcb.201104133
- Denizot, F. y Lang, R. (1986): "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability", *J. Immunol. Methods*, 89(2), pp.271-277. PMID: 3486233
- Deshpande, L.S., Limbrick, D.D. Jr., Sombati, S. y DeLorenzo, R.J. (2007): "Activation of a novel injury-induced calcium-permeable channel that plays a key role in causing extended neuronal depolarization and initiating neuronal death in excitotoxic neuronal injury", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 322(2), pp.443-452. PMID: 17483292
- Dickerson, B.C., Bakkour, A., Salat, D.H., Feczko, E., Pacheco, J., Greve, D.N., Grodstein, F., Wright, C.I., Blacker, D., Rosas, H.D., Sperling, R.A., Atri, A., Growdon, J.H., Hyman, B.T., Morris, J.C., Fischl, B. y Buckner, R.L. (2009): "The cortical signature of Alzheimer's disease: Regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals", *Cereb. Cortex*, 19(3), pp.497-510. PMID: 18632739. doi: 10.1093/cercor/bhn113
- Dickerson, B.C., Stoub, T.R., Shah, R.C., Sperling, R.A., Killiany, R.J., Albert, M.S., Hyman, B.T., Blacker, D. y Detolledo-Morrell, L. (2011): "Alzheimer-signature MRI biomarker predicts AD dementia in cognitively normal adults", *Neurology*, 76(16), pp.1395-1402. PMID: 21490323. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182166e96

- Doody, R.S., Gavrilova, S.I., Sano, M., Thomas, R.G., Aisen, P.S., Bachurin, S.O., Seely, L., Hung, D. y dimebon investigators. (2008): "Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study", *Lancet*, 372(9634), pp.207-215. PMID: 18640457. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61074-0
- Dreses-Werringloer, U., Lambert, J.C., Vingtdeux, V., Zhao, H., Vais, H., Siebert, A., Jain, A., Koppel, J., Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Pasquier, F., Galimberti, D., Scarpini, E., Mann, D., Lendon, C., Campion, D., Ampuyl, P., Davies, P. Foskett, J.K., Campagne, F. y Marambaud, P. (2008): "A polymorphism in CALHM1 influences Ca^{2+} homeostasis, $\text{A}\beta$ levels, and Alzheimer's disease risk", *Cell*, 133, pp.1149-1161. PMID: 18585350. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.048
- Dreses-Werringloer, U., Vingtdeux, V., Zhao, H., Chandakkar, P., Davies, P. y Marambaud, P. (2013): "CALHM1 controls the Ca^{2+} -dependent MEK, ERK, SRK, and MSK signaling cascade in neurons", *J. Cell Sci.*, 126 (Pt 5), pp.1199-1206. PMID: 23345406. doi: 10.1242/jcs.117135
- Dreyling, M.H., Martínez-Climent, J.A., Zheng, M., Maao, J., Rowley, J.D. y Bohlander, S.K. (1996): "The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93 (10), pp.4804-4809. PMID: 8643484
- Du, H. y Yan, S.S. (2010): "Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: cyclophilin D and amyloid beta", *Biochim Biophys. Acta*, 1802(1): pp.198-204. PMID: 19616093. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.07.005
- Du, G., Tu, H., Li, X., Pei, A., Chen, J., Miao, Z., Li, J., Wang, C., Xie, H., Xu, X. y Zhao, H. (2014): "Daphnetin, a natural coumarin derivative, provides the neuroprotection against glutamate-induced toxicity in HT22 cells and ischemic brain injury", *Neurochem. Res.*, 39(2), pp.269-275. PMID: 24343531. doi: 10.1007/s11064-013-1218-6
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Cummings, J. L., Dekosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Delacourte, A., Frisoni, G., Fox, N.C., Galasko, D., Gauthier, S., Hampel, H., Jicha, G. A., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Sarazin, M., de Souza, L. C., Stern, Y., Visser, P. J. y Scheltens, P. (2010): "Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon", *Lancet Neurol.*, 9(11), pp.1118-1127. PMID: 20934914. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70223-4
- Dujardin, S., Lécolle, K., Caillierez, R., Bégard, S., Zommer, N., Lachaud, C., Carrier, S., Dufour, N., Aurégan, G., Winderickx, J., Hantraye, P., Déglon, N., Colin, M. y Buée, L. (2014): "Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance in sporadic tauopathies", *Acta Neuropathol. Commun.*, 2(1), p.14. PMID: 24479894. doi: 10.1186/2051-5960-2-14
- Elliott, K., Ge, K., Du, W. y Prendergast, G.C. (2000): "The c-Myc interacting adaptor protein Bin1 activates a caspase-independent cell death program", *Oncogene*, 19(41), pp.4669-4684. PMID: 11032017
- Elliott, D.A., Tsoi, K., Holinkova, S., Chan, S.L., Kim, W.S., Halliday, G.M., Rye, K.A. y Garner, B. (2011): "Isoform-specific proteolysis of apolipoprotein-E in the brain", *Neurobiol. Aging*, 32(2), pp.257-271. PMID: 19278755 doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.02.006

- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. y Nagata, S. (1998): "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD", *Nature*, 391(6662), pp.43-50. PMID: 9422506
- Ezquerro, J.J., 2007: 100 años de enfermedad de Alzheimer. Alois Alzheimer: su vida y su obra. Historia de la enfermedad de Alzheimer, *Alzheimer Real Invest. Demenc.*, 35: 15-22
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Frasch, S.C., Warner, M.L. y Henson, P.M. (1998): "The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes", *Cell Death Differ.*, 5(7), pp.551-562. PMID: 10200509
- Fehér A, Juhász A, Rimanóczy A, Pákási M, Kálmán J, Janka Z. (2011): "No association between CALHM1 polymorphism and Alzheimer's disease risk in a Hungarian population", *Psychiatr. Genet.*, 21(5), pp.249-252. PMID: 21378601. doi: 10.1097/YPG.0b013e3283457bcc
- Ferreiro, E., Oliveira, C.R. y Pereira, C.M.F. (2008): "The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway", *Neurobiol. Dis.*, 30(3), pp.331-342. PMID: 18420416. doi: 10.1016/j.nbd.2008.02.003
- Fiandaca, M.S., Mapstone, M.E, Cheema, A.K., Federoff, H.J. (2014): "The critical need for defining preclinical biomarkers of Alzheimer's disease", *Alzheimers Dement.*, 10(3 Suppl), pp.S196-S212. PMID: 24924671. doi: 10.1016/j.jalz.2014.04.015
- Finger, T.E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D.L., Vigers, A.J., Stone, L., Hellekant, G., Kinnamon, S.C. (2005): "ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves", *Science*, 310(5753), pp.1495-1499. PMID: 16322458
- Fisk, L., Nalivaeva, N.N. y Turner, A.J. (2006): "Regulation of endothelin-converting enzyme-1 expression in human neuroblastoma cells", *Exp. Biol. Med.*, 231(6), pp.1048-1053. PMID: 16741047
- Frandsen A, Drejer J, Schousboe A. (1989): "Direct evidence that excitotoxicity in cultured neurons is mediated via N-methyl-D-aspartate (NMDA) as well as non-NMDA receptors", *J. Neurochem.*, 53(1), pp.297-299. PMID: 2566655
- Frank-Cannon, T.C., Alto, L.T., McAlpine, F.E. y Tansey, M.G. (2009): "Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?", *Mol. Neurodeg.*, 4: 47. PMID: 19917131. doi: 10.1186/1750-1326-4-47
- Gabbita, S.P., Lovell, M.A., y Markesbery, W.R. (1998): "Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease", *J. Neurochem.*, 71(5), pp.2034-2040. PMID: 9798928
- Gallego-Sandín, S., Alonso, M.T. y García-Sancho, J. (2011): "Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) reduces the calcium content of the endoplasmic reticulum (ER) and triggers ER stress", *Biochem. J.*, 437(3), pp.469-475. PMID: 21574960. doi: 10.1042/BJ20110479
- Galloway, P.G., Perry, G., Kosik, K.S. y Gambetti, P. (1987a): "Hirano bodies contain tau protein", *Brain Res.*, 403(2), pp.337-340. PMID: 3103867

- Galloway, P.G., Perry, G. y Gambetti, P. (1987b): "Hirano bodies filaments contain actin and actin-associated proteins", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 46(2), pp.185-199. PMID: 3029338
- Gamblin, T.C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A.L., Lu, M., Fu., Y., García-Sierra, F., LaPointe, N., Miller, R., Berry, R.W. y Binde, L.I. (2003): "Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(17), pp.10032-10037. PMID 12888622
- Garwood, C.J., Pooler, A.M., Atherton, J., Hanger, D.P. y Noble, W. (2011): "Astrocytes are important mediators of A β -induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture", *Cell Death Dis.*, 2: e167. PMID: 21633390 doi: 10.1038/cddis.2011.50
- Gendron, T.F. y Petrucelli, L. (2009): "The role of tau in neurodegeneration", *Mol. Neurodegener.*, 4: 13. PMID: 19284597 doi: 10.1186/1750-1326-4-13
- Gentleman, S.M., Nash, M.J., Sweeting, C.J., Graham, D.I. y Roberts, G.W. (1993): "Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury", *Neurosci. Lett.*, 160(2), pp.139-144. PMID: 8247344
- Gerasimenko, O. y Gerasimenko, J. (2004): "New aspects of nuclear calcium signalling", *J. Cell Sci.*, 117(Pt 15), pp.3087-3094. PMID: 15226390
- Gerson, J.E. y Kayed, R. (2013): "Formation and propagation of tau oligomeric seeds", *Front. Neurol.*, 4: 93. PMID: 23882255. doi: 10.3389/fneur.2013.00093
- Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., Vaillancourt, J.P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M.S., Clarke, E.E., Zheng, H., Van Der Ploeg, L.H., Ruffolo, S.C., Thornberry, N.A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R.J., Roy, S. y Nicholson, D.W. (1999): "Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid- β precursor protein and amyloidogenic Abeta peptide formation", *Cell*, 97(3), pp.395-406. PMID: 10319819
- Giacobini, E. (1997): "From molecular structure to Alzheimer therapy", *Jpn. J. Pharmacol.*, 74(3), pp.225-241. PMID: 9268083
- Giacobini, E. (2002): "Long-term stabilizing effect of cholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer' disease", *J. Neural Transm. Suppl.*, 2002(62), pp.181-187. PMID: 12456062
- Giacomello, M., Barbiero, L., Zatti, G., Squitti, R., Binetti, G., Pozzan, T., Fasolato, C., Ghidoni, R. y Pizzo, P. (2005): "Reduction of Ca²⁺ stores and capacitative Ca²⁺ entry is associated with the familial Alzheimer's disease presenilin-2 T122R mutation and anticipates the onset of dementia", *Neurobiol. Dis.*, 18(3), pp.638-648. PMID: 15755689
- Gibson, G.E. (2002): "Interactions of oxidative stress with cellular calcium dynamics and glucose metabolism in Alzheimer's disease", *Free Radic. Biol. Med.*, 32(11), pp.1061-1070. PMID: 12031890
- Giedraitis, V., Glaser, A., Sarajärvi, T., Brundin, R., Gunnarsson, M.D., Schjeide, B.M., Tanzi, R.E., Helisalmi, S., Pirttilä, T., Kilander, L., Lannfelt, L., Soininen, H., Bertram, L., Ingelsson, M. y Hiltunen, M. (2010): "CALHM1 P86L polymorphism

- does not alter amyloid-beta or tau in cerebrospinal fluid", *Neurosci. Lett.*, 469(2), pp.265-267. PMID: 20005921. doi: 10.1016/j.neulet.2009.12.011
- Gilman, S., Koller, M., Black, R.S., Jenkins, L., Griffith, S.G., Fox, N.C., Eisner, L., Kirby, L., Rovira, M.B., Forette, F., Orgogozo, J.M. y AN1792(QS-21)-201 Study Team (2005): "Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial", *Neurology*, 64(9), pp.1553-1562. PMID: 15883316
- Golby, A., Silverberg, G., Race, E., Gabrieli, S., O'Shea, J., Knierim, K., Stebbins, G. y Gabrieli, J., (2005): "Memory encoding in Alzheimer's disease: an fMRI study of explicit and implicit memory", *Brain*, 128(Pt 4), pp.773-787. PMID: 15705615
- Goldman, J.E. (1983): "The association of actin with Hirano bodies", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 42(2), pp.146-152. PMID: 6186777
- Golstein, P. y Kroemer, G. (2007): "Cell death by necrosis: towards a molecular definition", *Trends Biochem. Sci.*, 32(1), pp.37-43. PMID: 17141506
- González-Lafuente, L., Egea, J., León, R., Martínez-Sanz, F.J., Monjas, L., Pérez, C., Merino, C., García-De Diego, A.M., Rodríguez-Franco, M.I., García, A.G., Villarroja, M., López, M.G. y de Los Ríos, C. (2012): "Benzothiazepine CGP37157 and its isosteric 2'-methyl analogue provide neuroprotection and block cell calcium entry", *ACS Chem. Neurosci.*, 3(7), pp.519-529. PMID: 22860221. doi: 10.1021/cn300009e
- Gordon, J.W. y Ruddle, F.H. (1983): "Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection", *Methods Enzymol.*, 101, pp.411-433. PMID: 6577257
- Good, T.A., Smith, D.O. y Murphy, R.M. (1996): "Beta-amyloid peptide blocks the fast inactivating K⁺ current in rat hippocampal neurons", *Biophys. J.*, 70(1), pp.296-304. PMID: 8770205
- Gould, J., Reeve, H.L., Vaughan, P.F. y Peers, C. (1992): "Nicotinic acetylcholine receptors in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells", *Neurosci. Lett.*, 145(2), pp.201-204. PMID: 1465217
- Graeber, M.B. (2003): "History of Neuroscience: Alois Alzheimer (1864-1915)", *IBRO History of Neuroscience*. Disponible en http://www.ibro.info/Pub/Pub_Main_Display.asp?LC_Docs_ID=3445 (Consulta: 24 de mayo de 2014)
- Graier, W.F., Frieden, M. y Malli, R. (2007): "Mitochondria and Ca²⁺ signaling: old guests, new functions", *Pflugers Arch.*, 455(3), pp.375-396. PMID: 17611770
- Grammas, P., Samany, P.G. y Thirumangalakudi, L. (2006): "Thrombin and inflammatory proteins are elevated in Alzheimer's disease microvessels: implications for disease pathogenesis", *J. Alzheimers Dis.*, 9(1), pp.51-58. PMID: 16627934
- Granatiero, V., Patron, M., Tosatto, A., Merli, G. y Rizzuto, R. (2013): "The Use of aequorin and its variants for Ca²⁺ measurements" En Parys, J., Bootman, M.D., Yule, D.I. y Bultynck, G: "Calcium Techniques. A Laboratory Manual", Ed. Cold Spring Harb. Protoc., Nueva York. ISBN: 978-1-936113-58-3, pp. 177-192

- Green, K.N., Smith, I.F., y LaFerla, F.M. (2007): "Role of calcium in the pathogenesis of Alzheimer's disease and transgenic models", *Subcell. Biochem.*, 45, pp.507-521. PMID: 18193650
- Green, K.N. y LaFerla, F.M. (2008): "Linking calcium to A β and Alzheimer's disease", *Neuron*, 59(2), pp.190-194. PMID: 18667147. doi: 10.1016/j.neuron.2008.07.013
- Green, K.N., Demuro, A., Akbari, Y., Hitt, B.D., Smith, I.F., Parker, I. y LaFerla, F.M. (2008): "SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production", *J. Cell Biol.*, 181(7), pp.1107-1116. PMID: 18591429. doi: 10.1083/jcb.200706171
- Green, D.R. y Wang, R. (2010): "Calcium and energy: making the cake and eating it too?", *Cell*, 142(2), pp.200-202. PMID: 20655464. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.007
- Greenberg, S.M., Gurol, M.E., Rosand, J. y Smith, E.E. (2004): "Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment", *Stroke*, 35(11 Suppl 1), pp.2616-2619. PMID: 15459438
- Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A. y Tsien, R.Y. (2001): "Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications", *J. Biol. Chem.*, 276(31), pp.29188-29194. PMID: 11387331
- Grolla, A.A., Fakhfour, G., Balzaret, G., Marcello, E., Gardoni, F., Canonico, P.L., DiLuca, M., Genazzani, A.A. y Lim, D. (2013): "A β leads to Ca²⁺ signaling alterations and transcriptional changes in glial cells", *Neurobiol. Aging*, 34(2), pp.511-522. PMID: 22673114. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.005
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. y Tsien, R.Y. (1985): "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties", *J. Biol. Chem.*, 260(6), pp.3440-3450. PMID: 3838314
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S., Younkin, S., Hazrati, L., Collinge, J., Pocock, J., Lashley, T., Williams, J., Lambert, J.C., Amouyel, P., Goate, A., Rademakers, R., Morgan, K., Powell, J., St George-Hyslop, P., Singleton, A., Hardy, J. y Alzheimer Genetic Analysis Group (2012): "TREM2 Variants in Alzheimer's Disease", *N. Engl. J. Med.*, 368(2), pp.117-127. PMID: 23150934. doi: 10.1056/NEJMoa1211851
- Gursoy, E., Cardounel, A., Al-khlaiwi, T., Al-drees, A. y Kalimi, M. (2002): "Tamoxifen protects clonal mouse hippocampal (HT-22) cells against neurotoxins-induced cell death", *Neurochem. Int.*, 40(5), pp.405-412. PMID: 11821147
- Gustafson, D.R., Backman, K., Waern, M., Ostling, S., Guo, X., Zandi, P., Mielke, M.M., Bengtsson, C. y Skoog, I. (2009): "Adiposity indicators and dementia over 32 years in Sweden", *Neurology*, 73(19), pp.1559-1566. PMID: 19901247. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c0d4b6
- Ha, J.S. y Park, S.S. (2006): "Glutamate-induced oxidative stress, but not cell death, is largely dependent upon extracellular calcium in mouse neuronal HT22 cells", *Neurosci. Lett.*, 393(2-3), pp.165-169. PMID: 16229947

- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. y Sigworth F.J. (1981): "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches", *Pflugers Arch.*, 391(2), pp.85-100. PMID: 6270629
- Hansson-Petersen, C.A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P.F., Alafuzoff, I., Leinonen, V., Ito, A., Winblad, B., Glaser, E. y Ankarcrona, M. (2008): " The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(35), pp.13145-13150. PMID: 18757748. doi: 10.1073/pnas.0806192105
- Hardy, J. (1997): "Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease", *Trends Neurosci.*, 20(4), pp.154-159. PMID: 9106355
- Hardy, J. y Selkoe, D.J. (2002): "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics", *Science*, 297(5580), pp.353-356. PMID: 12130773
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P. Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvina, V., Dowzell, K., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Morgan, A.R., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M.K., Brayne, C., Rubinsztein, D.C., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Morgan, K., Brown, K.S., Passmore, P.A., Craig, D., McGuinness, B., Todd, S., Holmes, C., Mann, D., Smith, A.D., Love, S., Kehoe, P.G., Hardy, J., Mead, S., Fox, N., Rossor, M., Collinge, J., Maier, W., Jessen, F., Schürmann, B., Heun, R., van den Bussche, H., Heuser, I., Kornhuber, J., Wiltfang, J., Dichgans, M., Frölich, L., Hampel, H., Hüll, M., Rujescu, D., Goate, A.M., Kauwe, J.S., Cruchaga, C., Nowotny, P., Morris, J.C., Mayo, K., Sleegers, K., Bettens, K., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Van Broeckhoven, C., Livingston, G., Bass, N.J., Gurling, H., McQuillin, A., Gwilliam, R., Deloukas, P., Al-Chalabi, A., Shaw, C.E., Tsolaki, M., Singleton, A.B., Guerreiro, R., Mühleisen, T.W., Nöthen, M.M., Moebus, S., Jöckel, K.H., Klopp, N., Wichmann, H.E., Carrasquillo, M.M., Pankratz, V.S., Younkin, S.G., Holmans, P.A., O'Donovan, M., Owen, M.J. y Williams, J. (2009): "Genome wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease", *Nat. Genet.*, 41(10), pp.1088-1093. PMID: 19734902. doi: 10.1038/ng.440
- Hellström-Lindahl, E., Ravid, R. y Nordberg, A. (2008): "Age-dependent decline of neprilysin in Alzheimer's disease and normal brain: inverse correlation with A beta levels", *Neurobiol. Aging*, 29(2), pp.210-221. PMID: 17098332
- Heng, H.H. (2013): "Genomics: HeLa genome versus donor's genome", *Nature*, 501(7466), p.167. PMID: 24025829. doi: 10.1038/501167d
- Henquin, J.C. y Lambert, A.E. (1975): "Cobalt inhibition of insulin secretion and calcium uptake by isolated rat islets", *Am. J. Physiol.*, 228(6), pp.1669-1677. PMID: 1098481
- Hernández-SanMiguel, E., Vay, L., Santo-Domingo, J., Lobatón, C.D., Moreno, A., Montero, M. y Alvarez, J. (2006): "The mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger plays a key role in the control of cytosolic Ca²⁺ oscillations", *Cell Calcium*, 40(1), pp.53-61. PMID: 16720043
- Hippius, H. y Neundörfer, G. (2003): "The discovery of Alzheimer's disease", *Dialogues Clin. Neurosci.*, 5(1), pp.101-108. PMID: 22034141

- Hirano, A. (1994): "Hirano bodies and related neuronal inclusions", *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 20(1), pp.3-11. PMID: 8208338
- Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R. Gerrish, A., Lambert, J.C., Carrasquillo, M.M., Abraham, R., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvina, V., Dowzell, K., Jones, N., Stretton, A., Thomas, C., Richards, A., Ivanov, D., Widdowson, C., Chapman, J., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M.K., Brayne, C., Rubinsztein, D.C., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Brown, K.S., Passmore, P.A., Craig, D., McGuinness, B., Todd, S., Holmes, C., Mann, D., Smith, A.D., Beaumont, H., Warden, D., Wilcock, G., Love, S., Kehoe, P.G., Hooper, N.M., Vardy, E.R., Hardy, J., Mead, S., Fox, N.C., Rossor, M., Collinge, J., Maier, W., Jessen, F., Ruther, E., Schürmann, B., Heun, R., Kölsch, H., van den Bussche, H., Heuser, I., Kornhuber, J., Wiltfang, J., Dichgans, M., Frölich, L., Hampel, H., Gallacher, J., Hüll, M., Rujescu, D., Giegling, I., Goate, A.M., Kauwe, J.S., Cruchaga, C., Nowotny, P., Morris, J.C., Mayo, K., Sleegers, K., Bettens, K., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Van Broeckhoven, C., Livingston, G., Bass, N.J., Gurling, H., McQuillin, A., Gwilliam, R., Deloukas, P., Al-Chalabi, A., Shaw, C.E., Tsolaki, M., Singleton, A.B., Guerreiro, R., Mühleisen, T.W., Nothen, M.M., Moebus, S., Jöckel, K.H., Klopp, N., Wichmann, H.E., Pankratz, V.S., Sando, S.B., Aasly, J.O., Barcikowska, M., Wszolek, Z.K., Dickson, D.W., Graff-Radford, N.R., Petersen, R.C., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, van Duijn, C.M., Breteler, M.M., Ikram, M.A., DeStefano, A.L., Fitzpatrick, A.L., López, O., Launer, L.J., Seshadri, S., CHARGE consortium, Berr, C., Campion, D., Epelbaum, J., Dartigues, J.F., Tzourio, C., Alperovitch, A., Lathrop, M., EADI1 consortium, Feulner, T.M., Friedrich, P., Riehle, C., Krawczak, M., Schreiber, S., Mayhaus, M., Nicolhaus, S., Wagenpfeil, S., Steinberg, S., Stefansson, H., Stefansson, K., Snaedal, J., Björnsson S., Jonsson, P.V., Chouraki, V., Genier-Boley, B., Hiltunen, M., Soininen, H., Combarros, O., Zelenika, D., Delepine, M., Bullido, M.J., Pasquier, F., Mateo, I., Frank-García, A., Porcellini, E., Hanon, O., Coto, E., Álvarez, V., Bosco, P., Siciliano, G., Mancuso, M., Panza, F., Solfrizzi, V., Nacmias, B., Sorbi, S., Bossù, P., Piccardi, P., Arosio, B., Annoni, G., Seripa, D., Pilotto, A., Scarpini, E., Galimberti, D., Brice, A., Hannequin, D., Licastro, F., Jones, L., Holmans, P.A., Jonsson, T., Riemenschneider, M., Morgan, K., Younkin, S.G., Owen, M.J., O'Donovan, M., Amouyel, P. y Williams, J. (2011): "Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease", *Nat.Genet.*, 43(5), pp.429-435. PMID: 21460840. doi: 10.1038/ng.803
- Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V., Bayer, A., Jones, R.W., Bullock, R., Love, S., Neal, J.W., Zotova, E. y Nicoll, J.A. (2008): "Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial", *Lancet*, 372(9634), pp.216-223. PMID: 18640458. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61075-2
- Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E. y Swanson, P.E. (2009): "Cell death", *N. Engl. J. Med.*, 361(16), pp.1570-1583. PMID: 19828534. doi: 10.1056/NEJMra0901217
- Hroudová, J., Singh, N. y Fišar, Z. (2014): "Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's disease", *Biomed. Res. Int.*, 2014:175062. PMID: 24900954. doi: 10.1155/2014/175062
- Hyman, B.T., Van Hoesen, G.W., Damasio, A.R. y Barnes, C.L. (1984): "Alzheimer's disease: Cell-specific pathology isolates the hippocampal formation", *Science*, 225(4667), pp.1168-1170. PMID: 6474172

- Ikonomic, M.D., Klunk, W.E., Abrahamson, E.E., Mathis, C.A., Price, J.C., Tsopelas, N.D., Lopresti, B.J., Ziolko, S., Bi, W., Paljug, W.R., Debnath, M.L., Hope, C.E., Isanski, B.A., Hamilton, R.L. y DeKosky, S.T. (2008): "Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease", *Brain*, 131(Pt 6), pp.1630-1645. PMID: 18339640. doi: 10.1093/brain/awn016
- Inestrosa, N.C., Álvarez, A., Pérez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M. Linker, C., Casanueva, O.I., Soto, C. y Garrido, J. (1996): "Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme", *Neuron*, 16(4): 881-891. PMID: 8608006
- Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K.L., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Frosch, M.P., Albert, M.S., Hyman, B.T. e Iri-zarry, M.C. (2004): "Early A β accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain", *Neurology*, 62(6), pp.925-931. PMID: 15037694
- Inoue, K., Tanaka, N., Yamashita, F., Sawano, Y., Asada, T. y Goto, Y. (2010): "The P86L common allele of CALHM1 does not influence risk for Alzheimer disease in Japanese cohorts", *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.*, 153B(2), pp.532-535. PMID: 19655363. doi: 10.1002/ajmg.b.31014
- Inouye, S., Noguchi, M., Sakaki, Y., Takagi, Y., Miyata, T., Iwanaga, S., Miyata, T., Tsuji, F.I. (1985): "Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82(10), pp.3154-3158. PMID: 3858813
- Irvine, G.B., El-Agnaf, O.M., Shankar, G.M. y Walsh, D.M. (2008): "Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases", *Mol. Med.*, 14(7-8), pp.451-464. PMID: 18368143. doi: 10.2119/2007-00100
- Ishibashi, K., Ishiwata, K., Toyohara, J., Murayama, S. y Ishii, K. (2014): "Regional analysis of striatal and cortical amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease", *Eur. J. Neurosci.*, 40(4), pp.2701-2706. PMID: 24888235. doi: 10.1111/ejn.12633
- Itagaki, S., McGeer, P.L., Akiyama, H., Zhu, S. y Selkoe, D. (1989): "Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease", *J. Neuroimmunol.*, 24(3), pp.173-182. PMID: 2808689
- Jack, C.R. Jr, Lowe, V.J., Weigand, S.D., Wiste, H.J., Senjem, M.L., Knopman, D.S., Shiung, M.M., Gunter, J.L., Boeve, B.F., Kemp, B.J., Weiner, M., Petersen, R.C. y Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2009): "Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease", *Brain*, 132(Pt 5), pp.1355-1365. PMID: 19339253. doi: 10.1093/brain/awp062
- Jack, C.R. Jr (2012): "Alzheimer disease: new concepts on its neurobiology and the clinical role imaging will play", *Radiology*, 263(2), pp.344-361. PMID: 22517954 doi: 10.1148/radiol.12110433
- Jantas, D., Greda, A., Golda, S., Korostynski, M., Grygier, B., Roman, A., Pilc, A. y Lason, W. (2014): "Neuroprotective effects of metabotropic glutamate receptor group II and III activators against MPP(+)-induced cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: the impact of cell differentiation state", *Neuropharmacology*, 83, pp.36-53. PMID: 24713472. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.03.019

- Jaworska, A., Dzbek, J., Styczynska, M. y Kuznicki, J. (2013): "Analysis of calcium homeostasis in fresh lymphocytes from patients with sporadic Alzheimer's disease or mild cognitive impairment", *Biochim. Biophys. Acta*, 1833(7), pp.1692-1699. PMID: 23354174. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.01.012
- Jensen, L.M., Zhang, Y. y Shooter, E.M. (1992): "Steady-state polypeptide modulations associated with nerve growth factor (NGF)-induced terminal differentiation and NGF deprivation-induced apoptosis in human neuroblastoma cells", *J. Biol. Chem.*, 267(27):19325-19333. PMID: 1527053
- Jin, J. K., Choi, J. K., Wasco, W., Buxbaum, J. D., Kozlowski, P. B., Carp, R. I., Kim, Y. S., y Choi, E. K. (2005): "Expression of calsenilin in neurons and astrocytes in the Alzheimer's disease brain", *Neuroreport*, 16(5), pp.451-455. PMID: 15770150
- Johansson, S. (1994): "Graded action potentials generated by differentiated human neuroblastoma cells", *Acta Physiol. Scand.*, 151(3), pp.331-341. PMID: 7976405
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg S., Jonsdottir, I., Jonsson, P.V., Snaedal, J., Bjornsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A.I., Lah, J.J., Rujescu, D., Hampel, H., Giegling, I., Andreassen, O.A., Engedal, K., Ulstein, I., Djurovic, S., Ibrahim-Verbaas, C., Hofman, A., Ikram, M.A., van Duijn, C.M., Thorsteinsdottir, U., Kong, A. y Stefansson, K. (2012): "Variant of TREM2 Associated with the risk of Alzheimer's Disease", *N. Engl. J. Med.*, 368(2), pp.107-116. PMID: 23150908. doi: 10.1056/NEJMoa1211103
- Kalaria, R.N. (2010): "Vascular basis for brain degeneration: faltering controls and risk factors for dementia", *Nutr. Rev.*, 68(Suppl. 2), pp.S74-S87. PMID: 21091952. doi: 10.1111/j.1753-4887.2010.00352.x
- Katzman, R. (1993): "Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease", *Neurology*, 43(1), pp.13-20. PMID: 8423876
- Kauwe, J.S., Cruchaga, C., Bertelsen, S., Mayo, K., Latu, W., Nowotny, P., Hinrichs, A.L., Fagan, A.M., Holtzman, D.M., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Goate, A.M. (2010): "Validating predicted biological effects of Alzheimer's disease associated SNPs using CSF biomarker levels", *J. Alzheimers Dis.*, 21(3), pp.833-842. PMID: 20634593. doi: 10.3233/JAD-2010-091711
- Kawahara, M., Ohtsuka, I. Yokoyama, S., Kato-Negishi, M. y Sadakane, Y. (2011): "Membrane incorporation, channel formation, and disruption of calcium homeostasis by Alzheimer's β -amyloid protein", *Intl J. Alzheimer Dis.*, 2011: 304583. PMID: 21547225. doi: 10.4061/2011/304583
- Kazmi S.M. y Mishra, R.K. (1986): "Opioid receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: evidence for distinct morphine (μ) and enkephalin (δ) binding sites", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137(2), pp.813-820. PMID: 3015131
- Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J. y Kroemer, G. (2011): "Cell death assays for drug discovery", *Nat. Rev. Drug Discov.*, 10(3), pp.221-237. PMID: 21358741. doi: 10.1038/nrd3373
- Khanna, S., Roy, S., Maurer, M., Ratan, R.R. y Sen, C.K. (2006): "Oxygen-sensitive reset of hypoxia-inducible factor transactivation response: prolyl hydroxylases tune the

- biological normoxic set point", *Free Radic. Biol. Med.*, 40(12), pp.2147-2154. PMID: 16785028
- Kida, E., Choi-Miura, N.H. y Wisniewski, K.E. (1995): "Deposition of apolipoproteins E and J in senile plaques is topographically determined in both Alzheimer's disease and Down's syndrome brain", *Brain Res.*, 685(1-2), pp.211-216. PMID: 7583250
- Kim, H., Park, B.S., Lee, K.G., Choi, C.Y., Jang, S.S., Kim, Y.H. y Lee, S.E. (2005): "Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid", *J. Agric. Food Chem.*, 53(22), pp.8537-8541. PMID: 16248550
- Klünemann, H. H., Fronhöfer, W., Wurster, H., Fischer, W., Ibach, B. y Klein H. E. (2002): "Alzheimer's second patient: Johann F. and his family", *Ann. Neurol.*, 52(4), pp.520-523. PMID: 12325085
- Klunk, W.E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D.P., Bergström, M., Savitcheva, I., Huang, G.F., Estrada, S., Ausén, B., Debnath, M.L., Barletta, J., Price, J.C., Sandell, J., Lopresti, B.J., Wall, A., Koivisto, P., Antoni, G., Mathis, C.A. y Långström, B. (2004): "Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B", *Ann. Neurol.*, 55(3), pp.306-319. PMID: 14991808
- Knapp, M.J., Knopman, D.S., Solomon, P.R., Pendlebury, W.W., Davis, C.S. y Gracon, S.I. (1994): "A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group", *JAMA*, 271(13), pp.985-991. PMID: 8139083
- Knowles, R.B., Wyart, C., Buldyrev, S.V., Cruz, L., Urbanc, B., Hasselmo, M.E., Stanley, H.E. y Hyman, B.T. (1999): "Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(9), pp.5274-5279. PMID: 10220456
- Koh, S.H., Noh, M.Y. y Kim, S.H. (2008): "Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3", *Brain Res.*, 1188, pp.254-262. PMID: 18031715
- Kojetin, D.J., Venters, R.A., Kordys, D.R., Thompson, R.J., Kumar, R. y Cavanagh, J. (2006): "Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca²⁺-loaded calbindin-D(28K)", *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13(7), pp.641-647. PMID 16799559
- Koppel, J., Campagne, F., Vingtdoux, V., Dreses-Werringloer, U., Ewers, M., Rujescu, D., Hampel, H., Gordon, M.L., Christen, E., Chapuis, J., Greenwald, B.S., Davies, P. y Marambaud, P. (2011): "CALHM1 P86L polymorphism modulates CSF A β levels in cognitively healthy individuals at risk for Alzheimer's disease", *Mol. Med.*, 17(9-10), pp.974-979. PMID: 21629967. doi: 10.2119/molmed.2011.00154
- Krebs, J., Groenendyk, J. y Michalak, M. (2011): "Ca²⁺-signaling, alternative splicing and endoplasmic reticulum stress responses", *Neurochem. Res.*, 36(7), pp.1198-1211. PMID: 21365449. doi: 10.1007/s11064-011-0431-4
- Kroemer, G., Zamzami, N. y Susin, S.A. (1997): "Mitochondrial control of apoptosis", *Immunol. Today*, 18(1), pp.44-51. PMID: 9018974

- Krstic, D. y Knuesel, I. (2013): "Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease", *Nat. Rev. Neurol.*, 9(1), pp.25-34. PMID: 23183882. doi: 10.1038/nrneurol.2012.236
- Kumar, P., Tiwari, S. C., Goel, A., Sreenivas, V., Kumar, N., Tripathi, R. K., Gupta, V. y Dey, A. B. (2014): "Novel occupational therapy interventions may improve quality of life in older adults with dementia", *Intl. Arch. Med.*, 7: 26. PMID: 24982692. doi: 10.1186/1755-7682-7-26
- Kuramoto, T., Werrbach-Pérez, K., Pérez-Polo, J.R. y Haber, B. (1981): "Membrane properties of a human neuroblastoma II: Effects of differentiation", *J. Neurosci. Res.*, 6(4), pp.441-449. PMID: 6271987
- LaFerla, F.M. (2002): "Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease", *Nat. Rev. Neurosci.*, 3(11), pp.862-872. PMID: 12415294
- LaFerla, F.M., Green, K.N. y Oddo, S. (2007): "Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease", *Nat. Rev. Neurosci.*, 8(7), pp.499-509. PMID: 17551515
- Lambert, J.C., Sleegers, K., González-Pérez, A., Ingelsson, M., Beecham, G.W., Hiltunen, M., Combarros, O., Bullido, M.J., Brouwers, N., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Richard, F., DeKosky, S.T., Hannequin, S., Haines, J.L., Tognoni, G., Fiévet, N., Dartigues, J.F., Tzourio, C., Engelborghs, S., Arosio, B., Coto, E., De Deyn, P., Zompo, M., Mateo, I., Boada, M., Antúnez, C., López-Arrieta, J., Epelbaum, J., Schjeide, B.M.M., Frank-García, A., Giedraitis, V., Helisalmi, S., Porcellini, E., Pilotto, A., Forti, P., Ferri, R., Delepine, M., Zelenika, D., Lathrop, M., Scarpini, E., Siciliano, G., Solfrizzi, V., Sorbi, S., Spatelletta, G., Ravaglia, G., Valdivieso, F., Vepsäläinen, S., Álvarez, V., Bosco, P., Mancuso, M., Panza, F., Nacmias, B., Bossù, P., Hanon, O., Piccardi, P., Annoni, G., Mann, D., Marambaud, P., Seripa, D., Galimberti, D., Tanzi, R.E., Bertram, L., Lendon, C., Lannfelt, L., Licastro, F., Campion, D., Pericak-Vance, M.A., Soininen, H., Van Broeckhoven, C., Alperovitch, A., Ruiz, A., Kamboh, M.I. y Amouyel, P., 2010: "The CALHM1 P86L polymorphism is a genetic modifier of age at onset in Alzheimer's disease: a meta-analysis study", *J. Alzheimer Dis.*, 22(1), pp.247-255. PMID: 20847397. doi: 10.3233/JAD-2010-100933
- Larsson, K.P., Hansen, A.J. y Dissing, S. (2002): "The human SH-SY5Y neuroblastoma cell-line expresses a functional P2X7 purinoceptor that modulates voltage-dependent Ca^{2+} channel function", *J. Neurochem.*, 83(2), pp.285-298. PMID: 12423239
- LeBlanc, A.C., Chen, H.Y., Autilio-Gambetti, L. y Gambetti, P. (1991): "Differential APP gene expression in rat cerebral cortex, meninges, and primary astroglial, microglial and neuronal cultures", *FEBS Lett.*, 292(1-2), pp.171-178. PMID: 1959603
- LeBlanc, A., Liu, H., Goodyer, C., Bergeron, C. y Hammond, J. (1999): "Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease", *J. Biol. Chem.*, 274(33), pp.23426-23436. PMID: 10438520
- Lee, V.M. (2001): "Abeta immunization: moving Abeta peptide from brain to blood", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(15), pp.8931-8932. PMID: 11438712
- Lee, Y.S. y Silva, A.J. (2009): "The molecular and cellular biology of enhanced cognition", *Nat. Rev. Neurosci.*, 10(2), pp.126-140. PMID: 19153576. doi: 10.1038/nrn2572

- Leibson, C.L., Rocca, W.A., Hanson, V.A., Cha, R., Kokmen, E., O'Brien, P.C. y Palumbo, P.J. (1997): "The risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 826, pp.422-427. PMID: 9329716
- Leissring, M. A., Parker, I., y LaFerla, F. M. (1999): "Presenilin-2 mutations modulate amplitude and kinetics of inositol 1, 4,5-trisphosphate-mediated calcium signals", *J. Biol. Chem.*, 274(46), pp.32535-32538. PMID: 10551803
- Leuner, K., Pantel, J., Frey, C., Schindowski, K., Schulz, K., Wegat, T., Maurer, K., Eckert, A. y Müller, W. (2007): "Enhanced apoptosis, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphocytes as potential biomarkers for Alzheimer's disease", *J. Neural Transm. Suppl.*, 2007(72), pp.207-215. PMID: 17982897
- Li, L., Zhang, X., Yang, D., Luo, G., Chen, S. y Le, W. (2009): "Hypoxia increases A β generation by altering beta- and gamma-cleavage of APP", *Neurobiol. Aging*, 30(7). pp.1091-1098. PMID: 18063223
- Lin, M.T., Simon, D.K., Ahn, C.H., Kim, L.M. y Beal, M.F. (2002): "High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain", *Hum. Mol. Genet.*, 11(2), pp.133-145. PMID: 11809722
- Lin, K., Tang, M., Han, H., Guo, Y., Lin, Y. y Ma, C. (2010): "Association between the polymorphisms of CALHM1 and GOLPH2 genes and Alzheimer's disease", *Psychiatr. Genet.*, 20(4), p.190. PMID: 20592574. doi: 10.1097/YPG.0b013e32833a21cf
- Lindholm, D., Wootz, H. y Korhonen, L. (2006): "ER stress and neurodegenerative diseases", *Cell Death Differ.*, 13(3), pp.385-392. PMID: 16397584
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. y Gong, C.X. (2005): "Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation", *Eur. J. Neurosci.*, 22(8), pp.1942-1950. PMID: 16262633
- Liu, J., Li, L. y Suo, W.Z. (2009): "HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties", *Life Sci.*, 84(9-10), pp.267-271. PMID: 19135458. doi: 10.1016/j.lfs.2008.12.008
- Lizarbe, M.A. (2007): El suicidio y la muerte celular, *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat.*, 101, pp.1-33.
- Lock, J.T., Sinkins, W.G. y Schilling, W.P. (2011): "Effect of protein S-glutathionylation on Ca²⁺ homeostasis in cultured aortic endothelial cells", *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 300(2), pp.H493-H506. PMID: 21148766. doi: 10.1152/ajpheart.01073.2010
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. (2002): *Biología celular y molecular*, 4ª ed. Ed. Médica Panamericana., Madrid. ISBN 950-06-1366-2, pp.496-531
- Lorrio, S., Gómez-Rangel, V., Negredo, P., Egea, J., Leon, R., Romero, A., Dal-Cim, T., Villarroja, M., Rodríguez-Franco, M.I., Conde, S., Arce, M.P., Roda, J.M., García, A.G. y López, M.G. (2013): "Novel multitarget ligand ITH33/IQM9.21 provides neuroprotection in in vitro and in vivo models related to brain ischemia", *Neuropharmacology*, 67, pp.403-411. PMID: 23228428. doi: 10.1016/j.neuropharm

- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L. y Markesbery, W.R. (1998): "Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques", *J. Neurol. Sci.*, 158(1), pp.47-52. PMID: 9667777
- Low, W., Kasir, J. y Rahamimoff, H. (1993): "Cloning of the rat heart Na(+)-Ca²⁺ exchanger and its functional expression in HeLa cells", *FEBS Lett.*, 316(1), pp.63-67. PMID: 8422940
- Lu, G., Kwong, W. H., Li, Q., Wang, X., Feng, Z. y Yew, D. T. (2005): "bcl2, bax, and nestin in the brains of patients with neurodegeneration and those of normal aging", *J. Mol. Neurosci.*, 27(2), pp.167-174. PMID: 16186627
- Luan, K., Rosales, J.L. y Lee, K.Y. (2013): "Viewpoint: Crosstalks between neurofibrillary tangles and amyloid plaque formation", *Ageing Res. Rev.*, 12(1), pp.174-181. PMID: 22728532. doi: 10.1016/j.arr.2012.06.002
- Luchsinger, J.A., Tang, M.X., Stern, Y., Shea, S. y Mayeux, R. (2001): "Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort", *Am. J. Epidemiol.*, 154(7), pp.635-641. PMID: 11581097
- Luetjens, C.M., Bui, N.T., Sengpiel, B., Münstermann, G., Poppe, M., Krohn, A.J., Bauerbach, E., Kriegelstein, J. y Prehn, J.H. (2000): "Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production", *J. Neurosci.*, 20(15), pp.5715-5723. PMID: 10908611
- Lukiw, W. J. (2007): "Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus", *Neuroreport*, 18(3), pp.297-300. PMID: 17314675
- Lulevich, V., Zimmer, C.C., Hong, H.S., Jin, L.W. y Liu, G.Y. (2010): "Single-cell mechanics provides a sensitive and quantitative means for probing amyloid-beta peptide and neuronal cell interactions", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(31), pp.13872-13877. PMID: 20643929. doi: 10.1073/pnas.1008341107
- Lunnon, K., Smith, R., Hannon, E., De Jager, P.L., Srivastava, G., Volta, M., Troakes, C., Al-Sarraj, S., Burrage, J., Macdonald, R., Condliffe, D., Harries, L.W., Katsel, P., Haroutunian, V., Kaminsky, Z., Joachim, C., Powell, J., Lovestone, S., Bennett, D.A., Schalkwyk, L.C. y Mill, J. (2014): "Methylomic profiling implicates cortical deregulation of ANK1 in Alzheimer's disease", *Nat. Neurosci.*, 17(9), pp.1164-1170. PMID: 25129077. doi:10.1038/nn.3782
- Lv, R.J., He, J.S., Fu, Y.H., Shao, X.Q., Wu, L.W., Lu, Q., Jin, L.R. y Liu, H. (2011): "A polymorphism in CALHM1 is associated with temporal lobe epilepsy", *Epilepsy Behav.*, 20(4), pp.681-685. PMID: 21439911. doi: 10.1016/j.yebeh.2011.02.007
- Ma, Z., Siebert, A.P., Cheung, K.H., Lee, R.J., Johnson, B., Cohen, A.S., Vingtdoux, V., Marambaud, P. y Foskett, J.K. (2012): "Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) is the pore-forming subunit of an ion channel that mediates extracellular Ca²⁺ regulation of neuronal excitable cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(28), pp.E1963-E1971. PMID: 22711817. doi: 10.1073/pnas.1204023109
- Manczak, M., Park, B.S., Jung, Y. y Reddy, P.H. (2004): "Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early

- mitochondrial dysfunction and oxidative damage", *Neuromolecular Med.*, 5(2), pp.147-162. PMID: 15075441
- Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J. y Reddy, P.H. (2006): "Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression", *Hum. Mol. Genet.*, 15(9), pp.1437-1449. PMID: 16551656
- Manczak, M., Mao, P., Calkins, M., Cornea, A., Reddy, P.A., Murphy, M.P., Szeto, H.H., Park, B. y Reddy, P.H. (2010): "Mitochondria-targeted antioxidants protect against A beta toxicity in Alzheimer's disease neurons", *J. Alzheimers Dis.*, 20 Suppl 2, pp.S609-S631. PMID: 20463406. doi: 10.3233/JAD-2010-100564.
- Marín, R., Ramírez, C.M., González, M., González-Muñoz, E., Zorzano, A., Camps, M., Alonso, R. y Díaz, M. (2007): "Voltage-dependent anion channel (VDAC) participates in amyloid beta-induced toxicity and interacts with plasma membrane estrogen receptor alpha in septal and hippocampal neurons", *Mol. Membr. Biol.*, 24(2), pp.148-160. PMID: 17453421
- Martínez, E., Navarro, A., Ordóñez, C., Del Valle, E. y Tolivia, J. (2013): "Oxidative stress induces apolipoprotein D overexpression in hippocampus during aging and Alzheimer's disease", *J. Alzheimers Dis.*, 36(1), pp.129-144. PMID: 23568103. doi: 10.3233/JAD-130215
- Maroto, M., de Diego, A.M., Albiñana, E., Fernández-Morales, J.C., Caricati-Neto, A., Jurkiewicz, A., Yáñez, M., Rodríguez-Franco, M.I., Conde, S., Arce, M.P., Hernández-Guijo, J.M. y García, A.G. (2011): "Multi-target novel neuroprotective compound ITH33/IQM9.21 inhibits calcium entry, calcium signals and exocytosis", *Cell Calcium*, (50)4, pp.359-369. PMID: 21839513. doi: 10.1016/j.ceca.2011.06.006
- Masliah, E., Terry, R.D., Mallory, M., Alford, M. y Hansen, L.A. (1990): "Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease", *Am. J. Pathol.*, 137(6), pp.1293-1297. PMID: 2124413
- Masliah, E., Mallory, M., Hansen, L., DeTeresa, R., Alford, M. y Terry, R. (1994): "Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease", *Neurosci. Lett.*, 174(1), pp.67-72. PMID: 7970158
- Masliah, E. y Terry, R. (1993): "The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system", *Brain Pathol.*, 3(1), pp.77-85. PMID: 8269086
- Mattson, M.P. (2004): "Pathways towards and away from Alzheimer's disease", *Nature*, 430(7000), pp.631-639. PMID: 15295589
- Mauch, D.H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E.C., Otto, A. y Pfrieder, F.W. (2001): "CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol", *Science*, 294(5545), pp.1354-1357. PMID: 11701931
- Maurer, K., Volk, S. y Gerbaldo, H. (1997): "Auguste D. and Alzheimer's disease", *Lancet*, 349(9064), pp.1546-1549. PMID: 9167474
- Mayeux, R. y Stern, Y. (2012): "Epidemiology of Alzheimer disease", *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2(8), pii: a006239. PMID: 22908189. doi: 10.1101/cshperspect.a006239

- McKee, A.C., Cantu, R.C., Nowinski, C.J., Hedley-Whyte, E.T., Gavett, B.E., Budson, A.E., Santini, V.E., Lee, H.S., Kubilus, C.A. y Stern, R.A. (2009): "Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 68(7), pp.709-735. PMID: 19535999. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181a9d503
- McShane, R., Areosa Sastre, A. y Minakaran, N. (2006): "Memantine for dementia", *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2, CD003154. PMID: 16625572
- Mei, L., Roeske, W.R. y Yamamura, H.I. (1989): "The coupling of muscarinic receptors to hydrolysis of inositol lipids in human neuroblastoma SH-SY5Y cells", *Brain Res.*, 504(1), pp.7-14. PMID: 2557126
- Meltzer, C.C., Smith, G., DeKosky, S., Pollock, B.G., Mathis, C.A., Moore, R.Y., Kupfer, D.J. y Reynolds, C.F. III (1998): "Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: The emerging role of functional imaging", *Neuropsychopharmacology*, 18(6), pp.407-430. PMID: 9571651
- Merino-Serrais, P., Benavides-Piccione, R., Blázquez-Llorca, L., Kastanauskaite, A., Rábano, A., Ávila, J. y DeFelipe, J. (2013): "The influence of phospho- τ on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease", *Brain*, 136(Pt 6), pp.1913-1928. PMID: 23715095. doi: 10.1093/brain/awt088
- Merlini, M., Meyer, E.P., Ulmann-Schuler, A. y Nitsch, R.M. (2011): "Vascular β -amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcA β mice", *Acta Neuropathol.*, 122(3), pp.293-311. PMID: 21688176. doi: 10.1007/s00401-011-0834-y
- Miller, R.J. (1991): "The control of neuronal Ca^{2+} homeostasis", *Prog. Neurobiol.*, 37(3), pp.255-285. PMID: 1947178
- Minta, A., Kao, J.P. y Tsien, R.Y. (1989): "Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores", *J. Biol. Chem.*, 264(14), pp.8171-8178. PMID: 2498308
- Minster, R.L., Demirci, F.Y., DeKosky, S.T. y Kamboh, M.I. (2009): "No association between CALHM1 variation and risk of Alzheimer disease", *Hum. Mutat.*, 30(4), pp.E566-E569. PMID: 19191331. doi: 10.1002/humu.20989
- Missiaen, L., De Smedt, H., Droogmans, G. y Casteels, R.. (1992): "Ca $^{2+}$ release induced by inositol 1,4,5-trisphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal Ca $^{2+}$ in permeabilized cells", *Nature*, 357(6379), pp.599-602. PMID: 1608471
- Misztal, M., Frankiewicz, T., Parsons, C.G. y Danysz, W. (1996): "Learning deficits induced by chronic intraventricular infusion of quinolinic acid--protection by MK-801 and memantine", *Eur. J. Pharmacol.*, 296(1): 1-8. PMID: 8720470
- Montero, M., Alonso, M.T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibáñez, I., Albillos, A., García, A.G., García-Sancho, J. y Álvarez, J. (2000): "Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca $^{2+}$ transients that modulate secretion", *Nat. Cell Biol.*, 2(2), pp.57-61. PMID: 10655583

- Morad, M., Davies, N.W., Kaplan, J.H. y Lux, H.D. (1988): "Inactivation and block of calcium channels by photo-released Ca^{2+} in dorsal root ganglion neurons", *Science*, 241(4867), pp.842-844. PMID: 2457253
- Moreira, P.I., Zhu, X., Wang, X., Lee, H.G., Nunomura, A., Petersen, R.B., Perry, G. y Smith, M.A. (2010): "Mitochondria: a therapeutic target in neurodegeneration", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1802(1), pp.212-220. PMID: 19853657. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.10.007
- Moreno-Ortega, A.J., Ruiz-Nuño, A., García, A.G. y Cano-Abad, M.F. (2010): "Mitochondria sense with different kinetics the calcium entering into HeLa cells through calcium channels CALHM1 and mutated P86L-CALHM1", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 391(1), pp.722-726. PMID: 19944073. doi: 10.1016/j.bbrc.2009
- Mori, F., Lai, C.C., Fusi, F. y Giacobini, E. (1995): "Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex", *Neuroreport*, 6(4), pp.633-636. PMID: 7605915
- Morimoto, B.H. y Koshland, D.E. Jr. (1990): "Excitatory amino acid uptake and N-methyl-D-aspartate-mediated secretion in a neural cell line", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87(9), pp.3518-3521. PMID: 1970639
- Morimoto, B.H. y Koshland, D.E. Jr. (1990): "Induction and expression of long- and short-term neurosecretory potentiation in a neural cell line", *Neuron*, 5(6): 875-880. PMID: 1980069
- Morton, A.J., Hammond, C., Mason, W.T. y Henderson, G. (1992): "Characterisation of the L- and N-type calcium channels in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells: calcium imaging and single channel recording", *Brain Res Mol Brain Res.*, 13(1-2), pp.53-61. PMID: 1374505
- Mosconi, L., Berti, V., Swerdlow, R.H., Pupi, A., Duara, R. y De León, M. (2010): "Maternal transmission of Alzheimer's disease: Prodromal metabolic phenotype and the search for genes", *Hum. genomics*, 4(3), pp.170-193. PMID: 20368139
- Mosmann, T. (1983): "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J. Immunol. Methods.*, 65(1-2), pp.55-63. PMID: 6606682
- Moyer, B.D., Hevezi, O., Gao, N., Lu, M., Kalabat, D., Soto, H., Echeverri, F., Laita, B., Yeh, S.A., Zoller, M. y Zlotnik, A. (2009): "Expression of genes encoding multi-transmembrane proteins in specific primate taste cell populations", *PloS One*, 4(12): e7682. PMID: 19997627. doi:10.1371/journal.pone.0007682
- Müller, M., Cheung, K.H. y Foskett, J.K. (2011): "Enhanced ROS generation mediated by Alzheimer's disease presenilin regulation of InsP_3R Ca^{2+} signaling", *Antiox. Redox Signal.*, 14(7), pp.1225-1235. PMID: 20701429
- Müller, U., Winter, P. y Graeber, M.B. (2013): "A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease", *Lancet Neurol.*, 12(2), pp.129-130. PMID: 23246540. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70307-1
- Münch, G., Cunningham, A.M., Riederer, P. y Braak, E. (1998): "Advance glycation endproducts are associated with Hirano bodies in Alzheimer's disease", *Brain Res.*, 796(1-2), pp.307-310. PMID: 9689484

- Muñoz, D.G., Wang, D. y Greenberg, B.D. (1993): "Hirano bodies accumulate C-terminal sequences of β -amyloid precursor protein (beta-APP) epitopes", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 52(1), pp.14-21. PMID: 7678852
- Myers, R.H., Schaefer, E.J., Wilson, P.W., D'Agostino, R., Ordovas, J.M., Espino, A., Au, R., White, R.F., Knoefel, J.E., Cobb, J.L., McNulty, K.A., Beiser, A. y Wolf, P.A. (1996): "Apolipoprotein E epsilon4 association with dementia in a population-based study: the Framingham study", *Neurology*, 46(3), pp.673-677. PMID: 8618665
- Nacmias, B., Tedde, A., Bagnoli, S., Lucenteforte, E., Cellini, E., Piaceri, I., Guarnieri, B.M., Bessi, V., Bracco, L. y Sorbi, S. (2010): "Lack of implication for CALHM1 P86L common variation in Italian patients with early and late onset Alzheimer's disease". *J. Alzheimers Dis.*, 20(1), pp.37-41. PMID: 20164602. doi: 10.3233/JAD-2010-1345.
- Nagai, T., Sawano, A., Park, E.S. y Miyawaki A. (2001): "Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} ", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(6), pp.3197-3202. PMID: 11248055
- Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M. y Miyawaki, A. (2004): "Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca^{2+} by circularly permuted yellow fluorescent proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(29), pp.10554-10559. PMID: 15247428
- Nair, V.D., Niznik, H.B. y Mishra, R.K. (1996): "Interaction of NMDA and dopamine D2L receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells", *J. Neurochem.*, 66(6), pp.2390-2393. PMID: 8632161
- Nath, S., Aholme, L., Kurudenkandy, F.R., Granseth, B., Marcusson, J. y Hallbeck, M. (2012): "Spreading of neurodegenerative pathology via neuron-to-neuron transmission of β -amyloid", *J. Neurosci.*, 32(26), pp.8767-8777. PMID: 22745479. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0615-12.2012
- Neher, E. y Sakmann, B. (1976): "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres", *Nature*: 260(5554), pp.799-802. PMID: 1083489
- Nelson, O., Tu, H., Lei, T., Bentahir, M., De Strooper, B., y Bezprozvanny, I. (2007): "Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca^{2+} leak function of presenilin 1", *J. Clin. Invest.*, 117(5), pp.1230-1239. PMID: 17431506
- Nelson, P.T., Head, E., Schmitt, F.A., Davis, P.R. , Neltner, J.H. Jicha, G.A., Abner, E.L., Smith, C.D., Van Eldik, L.J., Kryscio, R.J. y Scheff, S.W. (2011): "Alzheimer's disease is not "brain aging": neuropathological, genetic, and epidemiological human studies", *Acta Neuropathol.*, 121(5), pp.571-587. PMID: 21516511. doi: 10.1007/s00401-011-0826-y
- Nicolau, S.M., de Diego, A.M., Cortés, L., Egea, J., González, J.C., Mosquera, M., López, M.G., Hernández-Guijo, J.M. y García, A.G. (2009): "Mitochondrial $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger blocker CGP37157 protects against chromaffin cell death elicited by veratridine", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 330(3), pp.844-854. PMID: 19509314. doi: 10.1124/jpet.109.154765
- Nicolau, S.M., Egea, J., López, M.G. y García, A.G. (2010): "Mitochondrial $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, a new target for neuroprotection in rat hippocampal slices", *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.*, 400(1), pp.140-144. PMID: 20713022. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.08.028
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. y Riccardi, C. (1991): "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry", *J. Immunol. Methods.*, 139(2), pp.271-279. PMID: 1710634
- Octave, J.N., Pierrot, N., Santos, S.F., Nalivaeva, N.N. y Turner, A.J. (2013): "From synaptic spines to nuclear signaling: nuclear and synaptic actions of the amyloid precursor protein", *J. Neurochem.*, 126(2), pp.183-190. PMID: 23495999. doi: 10.1111/jnc.12239
- Oertner, T.G., y Matus, A. (2005): "Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines", *Cell Calcium*, 37(5), pp.477-482. PMID: 15820396
- Oldershaw, K.A., Nunn, D.L. y Taylor, C.W. (1991): "Quantal Ca^{2+} mobilization stimulated by inositol 1,4,5-trisphosphate in permeabilized hepatocytes", *Biochem. J.*, 278(Pt 3), pp.705-708. PMID: 1898359
- Olgiati, P., Politis, .M., Ppadimitriou, G.N., De Ronch, D. y Serretti, A. (2011): "Genetics of late-onset Alzheimer's disease: update from Alzgene databasa and analysis shared pathways", *Intl. J. Alzheimers Dis.*, 2011: 832379. PMID: 22191060. doi: 10.40601/2011/823279
- Orgogozo, J.M., Gilman, S., Dartigues, J.F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L.C., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., Michel, B.F., Boada, M., Frank, A. y Hock, C. (2003): "Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta₄₂ immunization", *Neurology*, 61(1), pp.46-54. PMID: 12847155
- Ortiz-Terán, L., Santos, J.M.T, Cabrera Marín, M.N., y Ortiz Alonso, T. (2011): "Currently available neuroimaging approaches in Alzheimer Disease (AD) early diagnosis" En De La Monte, S. (2011): "The clinical spectrum of Alzheimer's disease - the charge toward comprehensive diagnostic and therapeutic strategies". Ed. InTech, Croacia. ISBN: 978-9533079936
- Ouh, I.O., Kim, Y.M., Gim, S.A. y Koh, P.O. (2013): "Focal cerebral ischemic injury decreases calbindin expression in brain tissue and HT22 cells", *Lab. Anim. Res.*, 29(3), pp.156-161. PMID: 24106510. doi: 10.5625/lar.2013.29.3.156
- Oyarce, A.M. y Fleming, P.J. (1991): "Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells", *Arch. Biochem. Biophys.*, 290(2), pp.503-510. PMID: 1929417
- Pack-Chung, E., Meyers, M. B., Pettingell, W. P., Moir, R. D., Brow- nawell, A. M., Cheng, I., Tanzi, R. E., y Kim, T. W. (2000): "Presenilin 2 interacts with sorcin, a modulator of the ryanodine receptor", *J. Biol. Chem.*, 275(19), pp.14440-14445. PMID: 10748169
- Palop, J.J., Jones, B., Kekonius, L., Chin, J., Yu, G.Q., Raber, J., Masliah, E. y Mucke, L. (2003): "Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(16), pp.9572-9577. PMID: 12881482
- Parekh, A.B., Terlau, H. y Stühmer, W. (1993): "Depletion of InsP3 stores activates a Ca^{2+} and K^{+} current by means of a phosphatase and a diffusible messenger", *Nature*, 364(6440), pp.814-818. PMID: 8395025

- Parodi, J., Sepúlveda, F.J., Roa, J., Opazo, C., Inestrosa, N.C. y Aguayo, L.G. (2010): "Beta-amyloid causes depletion of synaptic vesicles leading to neurotransmission failure", *J. Biol. Chem.*, 285(4), pp.2506-2514. PMID: 19915004. doi: 10.1074/jbc.M109.030023
- Patterson, C., Feightner, J.W., García, A., Hsiung, G.Y.R., MacKnight, C. y Sadovnik, A.D. (2008): "Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease", *Can. Med. Ass. J.*, 178(5), pp.548-556. PMID: 18299540 .doi: 10.1503/cmaj.070796
- Pearson, H.A. y Peers, C., 2006: "Physiological roles for amyloid beta peptides", *J. Physiol.*, 575(Pt 1), pp.5-10. PMID: 16809372
- Peppiatt, C.M., Collins, T.J., Mackenzie, L., Conway, S.J., Holmes, A.B., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Seo, J.T. y Roderick, H.L. (2003): "2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5,-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels", *Cell Calcium*, 34(1), pp.97-108. PMID: 12767897
- Petronilli V, Miotto G, Canton M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F (1998): "Imaging the mitochondrial permeability transition pore in intact cells", *Biofactors*, 8(3-4), pp.263-272. PMID: 9914828
- Pfeifer, L.A., White, L.R., Ross, G.W., Petrovich, H. y Launer, L.J. (2002): "Cerebral amyloid angiopathy and cognitive function: The HAAS autopsy study", *Neurology*, 58(11), pp.1629-1634. PMID: 12058090
- Pizzo, P. y Pozzan, T. (2007): "Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics", *Trends Cell Biol.* 17(10), pp-511-517. PMID: 17851078
- Pozzan, T. y Rizzuto, R. (2008): "Imaging calcium dynamics using targeted recombinant aequorins", *CSH Protoc.*, 2008: pdb.top26. PMID: 21356897. doi: 10.1101/ pdb.top26.
- Preis, P.N., Saya, H., Nádasdi, L., Hochhaus, G., Levin, V. y Sadée, W. (1988): "Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A", *Cancer Res.*, 48(22), pp.6530-6534. PMID: 2846152
- Price, S.A., Held, B. y Pearson, H.A. (1998): "Amyloid beta protein increases Ca²⁺ currents in rat cerebellar granule neurones", *Neuroreport*, 9(3), pp.539-545. PMID: 9512403
- Prince, M., Prina, M. y Guerchet, M., 2013: "World Alzheimer Report 2013. Journey of Caring. An analysis of long-term care for dementia", *Alzheimer's Disease International*, En: <http://www.alz.co.uk/research/world-report-2013> (Consultado el 14 de Mayo de 2014)
- Profenno, L.A., Porsteinsson, A.P. y Faraone, S.V. (2009): "Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders", *Biol. Psychiatry*, 67(6), pp.505-512. PMID: 19358976. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.02.013
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fa, M., Staniszewski, A., Palmeri, A. y Arancio, O. (2008): "Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus", *J. Neurosci.*, 28(53), pp.14537-14545. PMID: 19118188. doi: 10.1523/ JNEUROSCI.2692-08.2008

- Querfurth, H.W. y LaFerla, F.M. (2010): "Alzheimer's disease", *N. Engl. J. Med.*, 362(4), pp.329-344. PMID: 20107219. doi: 10.1056/NEJMra0909142
- Raffaitin, C., Gin, H., Empana, J.P., Helmer, C., Berr, C., Tzourio, C., Portet, F., Dartigues, J.F., Alpérovitch, A. y Barberger-Gateau, P. (2009): "Metabolic syndrome and risk for incident Alzheimer's disease or vascular dementia: the Three-City Study", *Diabetes Care*, 32(1), pp.169-174. PMID: 18945929. doi: 10.2337/dc08-0272
- Razay, G. y Vreugdenhil A. (2005): "Obesity in middle age and future risk of dementia: midlife obesity increases risk of future dementia", *BMJ*, 331(7514), p.455. PMID: 16110085
- Reddy, P.H., Mani, G., Park, B.S., Jacques, J., Murdoch, G., Whetsell, W. Jr., Kaye, J. y Manczak, M. (2005): "Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction", *J. Alzheimers Dis.*, 7(2), pp.103-117; discussion 173-180. PMID: 15851848
- Reddy, P.H. y Beal, M.F. (2008): "Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease", *Trends Mol Med.*, 14(2), pp.45-53. PMID: 18218341. doi: 10.1016/j.molmed.2007.12.002
- Reddy, P.H., Reddy, T.P., Manczak, M., Calkins, M.J., Shirendeb, U. y Mao, P. (2010): "Dynamin-Related Protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases", *Brain Res. Rev.*, 67(1-2):103-118. PMID: 21145355. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.11.004
- Reeve, H.L., Vaughan, P.F. y Peers, C. (1992): "Glibenclamide inhibits a voltage-gated K⁺ current in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y", *Neurosci Lett.*, 135(1), pp.37-40. PMID: 1542435
- Ren, G., Vajjhala, P., Lee J.S., Winsor, B. y Munn, A.L. (2006): "The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(1), pp.37-120. PMID: 16524918
- Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S. y Mobius, H.J. (2003): "Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease", *N. Engl. J. Med.*, 348(14), pp.1333-1341. PMID: 12672860
- Reitz, C., Brayne, C. y Mayeux, R. (2011): "Epidemiology of Alzheimer disease", *Nat. Rev. Neurol.*, 7(3), pp.137-152. PMID: 21304480. doi: 10.1038/nrneurol.2011.2
- Resende, R., Pereira, C., Agostinho, P., Vieira, A.P., Malva, J.O. y Oliveira, C.R. (2007): "Susceptibility of hippocampal neurons to A β peptide toxicity is associated with perturbation of Ca²⁺ homeostasis", *Brain Res.*, 1143, pp.11-21. PMID: 17336275
- Reuveny, E. y Narahashi, T. (1993): "Two types of high voltage-activated calcium channels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells", *Brain Res.*, 603(1), pp.64-73. PMID: 7680940
- Riascos, D., De León, D., Baker-Nigh, A., Nicholas, A., Yukhananov, R., Bu, J., Wu, C.K. y Geula, C. (2011): "Age-related loss of calcium buffering and selective neuronal vulnerability in Alzheimer's disease", *Acta Neuropathol.*, 122(5), pp.565-576. PMID: 21874328. doi: 10.1007/s00401-011-0865-4

- Ribe, E., Serrano-Saiz, E., Akpan, N. y Troy, C.M. (2008): "Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players", *Biochem. J.*, 415(2), pp.165-182. PMID: 18800967. doi: 10.1042/BJ20081118.
- Ridge, P.G., Ebbert, M.T.W. y Kauwe, J.S.K. (2013): "Genetics of Alzheimer's disease", *BioMed. Res. Intl.*, 2013: 254954. PMID: 23984328. doi: 10.1155/2013/254954
- Rizzuto, R., Simpson, A.W., Brini, M. y Pozzan, T. (1992): "Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin", *Nature*, 358(6384), pp.325-327. PMID: 1322496
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A. y Pozzan, T. (1998): "Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses", *Science*, 280(5370), pp.1763-1766. PMID: 9624056
- Rizzuto, R., Duchen, M.R. y Pozzan, T. (2004): "Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison", *Sci. STKE*, 2004(215):re1. PMID: 14722345
- Rizzuto, R. y Pozzan, T. (2006): "Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences", *Physiol. Rev.*, 86(1), pp.369-408. PMID: 16371601
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J.H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C.T., Cheng, R., Hasegawa, H., Chen, F., Shibata, N., Lunetta, K.L., Pardossi-Piquard, R., Bohm, C., Wakutani, Y., Cupples, L.A., Cuenco, K.T., Green, R.C., Pinassi, L., Rainero, I., Sorbi, S., Bruni, A., Duara, R., Friedland, R.P., Inzelberg, R., Hampe, W., Bujo, H., Song, Y.Q., Andersen, O.M., Willnow, T.E., Graff-Radford, N., Petersen, R.C., Dickson, D., Der, S.D., Fraser, P.E., Schmitt-Ulms, G., Younkin, S., Mayeux, R., Farrer, L.A y St. George-Hyslop, P. (2007): "The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease", *Nat. Genet.*, 39(2), pp.168-177. PMID: 17220890
- Roher, A.E., Weiss, N., Kokjohn, T.A., Kuo, Y.M., Kalback, W., Anthony, J., Watson, D., Luehrs, D.C., Sue, L., Walker, D., Emmerling, M., Goux, W. y Beach, T. (2002): "Increased A beta peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in Alzheimer's disease", *Biochemistry*, 41(37), pp.11080-11090. PMID: 12220172
- Roher, A.E., Esh, C.L., Kokjohn, T.A., Castaño, E.M., Van Vickle, G.D., Kalback, W.M., Patton, R.L., Luehrs, D.C., Daus, I.D., Kuo, Y.M., Emmerling, M.E., Soares, H., Quinn, J.F., Kaye, J., Connor, D.J., Silverberg, N.B., Adler, C.H., Seward, J.D., Beach, T.G. y Sabbagh, M.N. (2009): "Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease", *Alzheimers Dement.*, 5(1), pp.18-29. PMID: 19118806. doi: 10.1016/j.jalz.2008.10.004
- Rohn, T.T., Catlin, L.W., Coonse, K.G. y Habig, J.W. (2012): "Identification of an amino-terminal fragment of apolipoprotein E4 that localizes to neurofibrillary tangles of the Alzheimer's disease brain", *Brain Res.*, 1475: 106-115. PMID: 22902767. doi: 10.1016/j.brainres.2012.08.003
- Rohn, T.T. (2013): "Proteolytic cleavage of apolipoprotein E4 as the keystone of the heightened risk associated with Alzheimer's disease", *Intl. J. Mol. Sci.*, 14(7), pp.14908-14922. PMID: 23867607. doi:10.3390/ijms140714908

- Rosenblum, W.I. (2014): "Why Alzheimer trials fail: removing soluble oligomeric beta amyloid is essential, inconsistent, and difficult", *Neurobiol. Aging*, 35(5), pp.969-974. PMID: 24210593. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.085
- Roskoski, R. (2012): "ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation", *Pharmacol. Res.*, 66(2), pp.105-143. PMID: 22569528 doi: 10.1016/j.phrs.2012.04.005.
- Rossiter, J.P., Anderson, L.L., Yang, F. y Cole, G.M. (2000): "Caspase-cleaved actin (fractin) immunolabeling of Hirano bodies", *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 26(4), pp.342-346. PMID: 10931367
- Rubio-Moscardo, F., Setó-Salvia, N., Pera, M., Bosch-Morató, M., Plata, C., Belbin, O., Gené, G., Dols-Icardo, O., Ingelsson, M., Helisalmi, S., Soininen, H., Hiltunen, M., Giedraitis, V., Lannfelt, L., Frank, A., Bullido, M.J., Combarros, O., Sánchez-Juan, P., Boada, M., Tàrraga, L., Pastor, P., Pérez-Tur, J., Baquero, M., Molinuevo, J.L., Sánchez-Valle, R., Fuentes-Prior, P., Fortea, J., Blesa, R., Muñoz, F.J., Lleó, A., Valverde, M.A. y Clarimón, J. (2013): "Rare variants in calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) found in early onset Alzheimer's disease patients alter calcium homeostasis", *PloS One*, 8(9):e74203. PMID: 24069280. doi: 10.1371/journal.pone.0074203.
- Ruiz, A., Alberdi, E. y Matute, C. (2014): "CGP37157, an inhibitor of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger, protects neurons from excitotoxicity by blocking voltage-gated Ca²⁺ channels", *Cell Death Dis.*, 5: e1156. PMID: 24722281. doi: 10.1038/cddis.2014.134
- Rumble, B., Retallack, R., Hilbich, C., Simms, G., Multhaup, G., Martins, R., Hockey, A., Montgomery, P., Beyreuther, K. y Masters, C. L. (1989): "Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease", *N. Engl. J. Med.*, 320(22), pp.1446-1452 PMID: 2566117
- Rusakov, D.A. y Fine, A. (2003): "Extracellular Ca²⁺ depletion contributes to fast activity-dependent modulation of synaptic transmission in the brain", *Neuron*, 37(2), pp. 287-297. PMID: 12546823
- Sabbagh, M.N., Malek-Ahmadi, M., Dugger, B.N., Lee, K., Sue, L.I., Serrano, G., Walker, D.G., Davis, K., Jacobson, S.A. y Beach, T.G. (2013): "The influence of Apolipoprotein E genotype on regional pathology in Alzheimer's disease", *BMC Neurol.*, 13: 44. PMID: 23663404. doi: 10.1186/1471-2377-13-44
- Sagare, A.P., Bell, R.D. y Zlokovic, B.V. (2012): "Neurovascular dysfunction and faulty amyloid beta-peptide clearance in Alzheimer disease", *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2(10): pii: a011452. PMID: 23028132. doi: 10.1101/cshperspect.a011452
- Saido, T.C. (2013): "Metabolism of amyloid β peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease", *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.*, 89(7), pp.321-339. PMID: 23883611
- Sakono, M. y Zako, T. (2010): "Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers", *FEBS J.*, 277(6), pp.1348-1358. PMID: 20148964. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x
- Salloway, S., Sperling, R., Fox, N.C., Blennow, K., Klunk, W., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L.S., Porsteinsson, A.P., Ferris, S., Reichert, M., Ketter, N., Nejadnik, B., Guenzler, V., Miloslavsky, M., Wang, D., Lu, Y., Lull, J., Tudor, I.C., Liu, E.,

- Grundman, M., Yuen, E., Black, R., Brashear, H.R. y Bapineuzumab 301 and 302 Clinical Trial Investigators (2014): "Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease", *N. Engl. J. Med.*, 370(4), pp.322-333. PMID: 24450891. doi: 10.1056/NEJMoa1304839
- Sammels, E., Parys, J.B., Missiaen, L., De Smedt, H. y Bultynck, G. (2010): "Intracellular Ca²⁺ storage in health and disease: a dynamic equilibrium", *Cell Calcium*, 47(4), pp.297-314. PMID: 20189643. doi: 10.1016/j.ceca.2010.02.001
- Sanz-Blasco, S., Valero, R.A., Rodríguez-Crespo, I., Villalobos, C. y Núñez, L. (2008): "Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies A β oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs", *PloS One*, 3(7): e2718. PMID: 18648507. doi: 10.1371/journal.pone.0002718
- Satoh, T., Nakatsuka, D., Watanabe, Y., Nagata, I., Kikuchi, H. y Namura S. (2000): "Neuroprotection by MAPK/ERK kinase inhibition with U0126 against oxidative stress in a mouse neuronal cell line and rat primary cultured cortical neurons", *Neurosci. Lett.*, 288(2), pp.163-166. PMID: 10876086
- Saxena, S. y Wortmann, M. (2012): "Dementia: A public health priority". Ed. *World Health Organisation*, Washington. ISBN: 978-9241564458
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vásquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. y Seubert, P. (1999): "Immunization with amyloid- beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse", *Nature*, 400(6740), pp.173-177. PMID: 10408445
- Schon, E.A. y Ára-Gómez, E. (2013): "Mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease", *Mol. Cell Neurosci.*, 55, pp.26-36. PMID: 22922446. doi: 10.1016/j.mcn.2012.07.011
- Scott Bitner, R. (2012): "Cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation: a mechanistic marker in the development of memory enhancing Alzheimer's disease therapeutics", *Biochem. Pharmacol.*, 83(6), pp.705-714. PMID: 22119240. doi: 10.1016/j.bcp.2011.11.009
- Scrimgeour NR1, Wilson DP, Rychkov GY (2012): "Glu¹⁰⁶ in the Orai1 pore contributes to fast Ca²⁺-dependent inactivation and pH dependence of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) current", *Biochem. J.*, 441(2), pp-743-753. PMID: 21967483. doi: 10.1042/BJ20110558
- Selkoe, D.J., Podlisny, M.B., Joachim, C.L., Vickers, E.A., Lee, G., Fritz, L.C. y Oltersdorf, T. (1988): "Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85(19), pp.7341-7345. PMID: 3140239
- Selkoe, D.J. (2002): "Alzheimer's disease is a synaptic failure", *Science*, 298(5594), pp.789-791. PMID: 12399581
- Sepúlveda, F.J., Parodi, J., Peoples, R.W., Opazo, C. y Aguayo, L.G. (2010): "Synaptotoxicity of Alzheimer beta amyloid can be explained by its membrane

- perforating property", *PloS One*, 5(7): e11820. PMID: 20676404. doi: 10.1371/journal.pone.0011820
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.L., Grognet, P., Bombois, S., Blum, D., Delacourte, A., Pasquier, F., Vanmechelen, E., Schraen-Maschke, S. y Buée, L. (2008): "Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders", *Expert. Rev. Proteomics*, 5(2), pp.207-224. PMID: 18466052. doi: 10.1586/14789450.5.2.207
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E. y Hyman, B.T. (2011a): "Neuropathological alterations in Alzheimer disease", *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 1: a006189. PMID: 22229116. doi: 10.1101/cshperspect.a006189
- Serrano-Pozo, A., Mielke, M.L., Gómez-Isla, E., Betensky, R.A., Growdon, J.H., Frosch, M.P. y Hyman B.T. (2011b): "Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease", *Am. J. Pathol.*, 179(3), pp.1373-1384. PMID: 21777559. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.047
- Sheng, B., Wang, X., Su, B., Lee, H.G., Casadesus, G., Perry, G. y Zhu, X. (2012): "Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease", *J. Neurochem.*, 120(3), pp.419-429. PMID: 22077634. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07581.x
- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J. y Zlokovic, B.V. (2000): "Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier", *J. Clin. Invest.*, 106(12), pp.1489-1499. PMID: 11120756
- Shibata, N., Kuerban, B., Komatsu, M., Ohnuma, T., Baba, H. y Arai, H. (2010): "Genetic association between CALHM1, 2, and 3 polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population", *J. Alzheimers Dis.*, 20(2), pp.417-421. PMID: 20164573. doi: 10.3233/JAD-2010-1380.
- Shimohama, S., Tanino, H., Kawakami, N., Okamura, N., Kodama, H., Yamaguchi, T., Hayakawa, T., Nunomura, A., Chiba, S., Perry, G., Smith, M.A. y Fujimoto, S. (2000): "Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 273(1), pp.5-9. PMID: 10873554
- Shimomura, O., Johnson, F.H. y Saiga, Y. (1962): "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea", *J. Cell Comp. Physiol.*, 59, pp.223-239. PMID: 13911999
- Shimomura O., Johnson, F.H. y Saiga, Y. (1963): "Microdetermination of calcium by aequorin luminescence", *Science*, 140(3573):1339-1340. PMID: 17802177
- Siebert, A.P., Ma, Z., Grevet, J.D., Demuro, A., Parker, I. y Foskett, J.K. (2013): "Structural and functional similarities of calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) ion channel with connexins, pannexins, and innexins", *J. Biol. Chem.*, 288(9), pp.6140-6153. PMID: 23300080. doi: 10.1074/jbc.M112.409789
- Skloot, R. (2012): *La vida inmortal de Henrietta Lacks*. Ed. Temas de hoy (Planeta), Madrid; ISBN 978-84-8460-993-3

- Slee, E.A., Adrain, C. y Martin, S.J. (2001): "Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis", *J. Biol. Chem.*, 276(10), pp.7320-7326. PMID: 11058599
- Sleegers, K., Brouwers, N., Bettens, K., Engelborghs, S., van Miegroet, H., De Deyn, P.P. y Van Broeckhoven, C. (2009): "No association between CALHM1 and risk for Alzheimer dementia in a Belgian population", *Hum. Mutat.*, 30(4), pp.E570-E574. PMID: 19191332. doi: 10.1002/humu.20990
- Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A. y Markesbery, W.R. (1991): "Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88(23), pp.10540-10543. PMID: 1683703
- Smith, M.A. (1998): "Alzheimer disease", *Intl. Rev. Neurobiol.*, 42, pp.1-54. PMID: 9476170
- Smith-Swintosky, V.L. y Mattson, M.P. (1994): "Glutamate, beta-amyloid precursor proteins, and calcium mediated neurofibrillary degeneration", *J. Neural Transm. Suppl.*, 44, pp.29-45. PMID: 7897398
- Smyth, J.T., Dehaven, W.I., Jones, B.F., Mercer, J.C., Trebak, M., Vázquez, G. y Putney, J.W., Jr. (2006): "Emerging perspectives in store-operated Ca²⁺ entry: roles of Orai, Stim and TRP", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1763(11), pp.1147-1160. PMID: 17034882
- Solano, D.C., Sironi, M., Bonfini, C., Solerte, S.B. Govoni, S. y Racchi, M. (2000): "Insulin regulates soluble amyloid precursor protein release via phosphatidyl inositol 3 kinase-dependent pathway", *FASEB J.*, 14(7), pp.1015-1022. PMID: 10783157
- Sontag, E., Luangpirom, A., Hladik, C., Mudrak, I., Ogris, E., Speciale, S. y White, C.L. 3rd, (2004): "Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A β Alphac enzyme are associated with Alzheimer disease pathology", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 63(4), pp.287-301. PMID: 15099019
- Stadelmann, C., Deckwerth, T.L., Srinivasan, A., Bancher, C., Brück, W., Jellinger, K. y Lassmann, H. (1999): "Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic vacuoles of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death", *Am. J. Pathol.*, 155(5), pp.1459-1466. PMID: 10550301
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E. y Mandelkow, E.M. (2002): "Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress", *J. Cell Biol.*, 156(6), pp.1051-1063. PMID: 11901170
- Steinbach, S., Hundt, W., Vaitl, A., Heinrich, P., Förster, S., Bürger, K. y Zahnert, T. (2010): "Taste in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease", *J. Neurol.*, 257(2), pp.238-246. PMID: 19727902. doi: 10.1007/s00415-009-5300-6
- Stokin, G.B., Lillo, C., Falzone, T.L., Brusch, R.G., Rockenstein, E., Mount, S.L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D.S. y Goldstein, L.S. (2005): "Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease", *Science*, 307(5713), pp.1282-1288. PMID: 15731448
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S. y Roses, A.D. (1993): "Apolipoprotein E: High-avidity binding to β -amyloid and

- increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90(5), pp.1977-1981. PMID: 8446617
- Stutzmann, G.E. y Mattson, M.P. (2011): "Endoplasmic reticulum Ca(2+) handling in excitable cells in health and disease", *Pharmacol. Rev.*, 63(3), pp.700-727. PMID: 21737534. doi: 10.1124/pr.110.003814
- Su, J.H., Cummings, B.J y Cotman, C.W. (1994): "Subpopulations of dystrophic neuritis in Alzheimer's brain with distinct immunocytochemical and argentophilic characteristics", *Brain Res.*, 637(1-2), pp.37-44. PMID: 8180819
- Summers, W.K. (2006): "Tacrine, and Alzheimer's treatments", *J. Alzheimer Dis.*, 9(3 Suppl.), pp.439-445. PMID: 16914883
- Swerdlow, R.H. (2012): "Mitochondria and cell bioenergetics: increasingly recognised components and a possible etiologic cause of Alzheimer's disease", *Antiox. Redox Sign.*, 16(12), pp.1434-1463. PMID: 21902597. doi: 10.1089/ars.2011.4149
- Taghizadeh, M., Talaei, S.A., Djazayeri, A. y Salami, M. (2014): "Vitamin D supplementation restores suppressed synaptic plasticity in Alzheimer's disease", *Nutr. Neurosci.*, 17(4), pp. 172-177. PMID: 23883541. doi: 10.1179/1476830513Y.0000000080
- Takahashi, K., Rochford, C.D. y Neumann, H. (2005): "Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2", *J. Exp. Med.*, 201(4), pp.647-657.
- Takashima, A., Yamaguchi, H., Noguchi, K., Michel, G., Ishiguro, K., Sato, K., Hoshino, T., Hoshi, M. e Imahori, K. (1995): "Amyloid β peptide induces cytoplasmic accumulation of amyloid protein precursor via tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β in rat hippocampal neurons", *Neurosci. Lett.*, 198(2), pp.83-86. PMID: 8592647
- Tampellini, D., Rahman, N., Lin, M.T., Capetillo-Zárate, E. y Gouras, G.K. (2011): "Impaired β -amyloid secretion in Alzheimer's disease pathogenesis", *J. Neurosci.*, 31(43), pp.15384-15390. PMID: 22031884. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2986-11.2011
- Tan, E.K., Ho, P., Cheng, S.Y., Yih, Y., Li, H.H., Fook-Chong, S., Lee, W.L. y Zhao, Y. (2011): "CALHM1 variant is not associated with Alzheimer's disease among Asians", *Neurobiol. Aging*, 32(3): 546.e11-2. PMID: 19545933. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.05.008.
- Tanaka, N., Abe-Dohmae, S., Iwamoto, N. y Yokoyama, S. (2011): "Roles of ATP-binding cassette transporter A7 in cholesterol homeostasis and host defense system". *J. Ather. Tromb.*, 18(4), pp.274-281. PMID: 21173549
- Tanis, J.E., Ma, Z., Krajacic, P., He, L., Foskett, K y Lamitina, T. (2013): "CLHM-1 is a functionally conserved and conditional toxic Ca²⁺-permeable ion in channel in *Caenorhabditis elegans*", *J. Neurosci.*, 33(30), pp.12275-12286. PMID: 23884934. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5919-12.2013
- Tao, Q.Q., Sun, Y.M., Liu, Z.J., Yang, P., Li, H.L., Lu, S.J. y Wu, Z.Y. (2014): "Lack of association between CALHM1 PP86L variation and Alzheimer's disease in the Han

- Chinese population", *Neurobiol. Aging*, 35(8):1956.e13-4. PMID: 24630757. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.013
- Tariot, P.N., Farlow, M.R., Grossberg, G.T., Graham, S.M., McDonald, S. y Gergel, I. y Memantine study group (2004): "Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial", *JAMA*, 291(3), pp.317-324. PMID: 14734594
- Taruno, A., Vingtdeux, V., Ohmoto, M., Ma, Z., Dvoryanchikov, G., Li, A., Adrien, L., Zhao, H., Leung, S., Abernethy, M., Koppel, J., Davies, P., Civan, M.M., Chaudhari, N., Matsumoto, I., Hellekant, G., Tordoff, M.G., Marambaud, P., Foskett, J.K. (2013a): "CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes", *Nature*, 495(7440), pp.223-226. PMID: 23467090. doi: 10.1038/nature11906.
- Taruno, A., Matsumoto, I., Ma, Z., Marambaud, P. y Foskett, J.K. (2013b): "How do taste cells lacking synapses mediate neurotransmission? CALHM1, a voltage-gated ATP channel", *Bioessays*, 35(12), pp.1111-1118. PMID: 24105910. doi: 10.1002/bies.201300077
- Terry, R., Peck, A., DeTeresa, R., Schechter, R. y Horoupian, D. (1981): "Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type", *Ann. Neurol.*, 10(2), pp.184-192. PMID: 7283403
- Thambisetty, M., Beason-Held, L., An, Y., Kraut, M.A. y Resnick, S.M. (2010): "APOE epsilon4 genotype and longitudinal changes in cerebral blood flow in normal aging", *Arch. Neurol.*, 67(1), pp.93-98. PMID: 20065135. doi: 10.1001/archneurol.2009.913
- Thiele, C., Gerdes, H.H. y Huttner, W.B. (1997): "Protein secretion: puzzling receptors", *Curr. Biol.*, 7(8): R496-500. PMID: 9259537
- Tian, J., Shi, J., Smallman, R., Iwatsubo, T. y Mann, D. (2006): "Relationships in Alzheimer's disease between the extent of Abeta deposition in cerebral blood vessel walls, as cerebral amyloid angiopathy, and the amount of cerebrovascular smooth muscle cells and collagen", *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 32(3), pp.332-340. PMID: 16640651
- Tola-Arribas, M.A., Yugueros, M.I., Garea, M.J., Ortega-Valín, F., Cerón-Fernández, A., Fernández-Malvido, B., San José-Gallegos, A., González-Touya, M., Botrán-Velicia, A., Iglesias-Rodríguez, V. y Díaz-Gómez, B. (2013): "Prevalence of dementia and subtypes in Valladolid, northwestern Spain: the DEMINVALL study", *PloS One*, 8(10):e77688. PMID: 24147055.
- Tomasi, G., Edison, P., Bertoldo, A., Roncaroli, F., Singh, P., Gerhard, A., et al., 2008: "Novel reference region model reveals increased microglial and reduced vascular binding of C-(R)-PK11195 in patients with Alzheimer's disease", *J. Nucl. Med.*, 49 (8): 1249-1256. doi: 10.1371/journal.pone.0077688
- Tordoff, M.G., Ellis, H.T., Aleman, T.R., Downing, A., Marambaud, P., Foskett, J.K., Dana, R.M. y McCaughey, S.A. (2014): "Salty taste deficits in CALHM1 knockout mice", *Chem. Senses*, 39(6), pp.515-528. PMID: 24846212. doi: 10.1093/chemse/bju020.
- Travis, J. (1992): "Scoring a technical knockout in mice", *Science*, 256(5062), pp.1392-1394. PMID: 1351316

- Trinh, N.H., Hoblyn, J., Mohanty, S. y Yaffe, K. (2003): "Efficacy of cholinesterase inhibitors in the treatment of neuropsychiatric symptoms and functional impairment in Alzheimer disease: a meta-analysis", *JAMA*, 289(2), pp.210-216. PMID: 12517232
- Truong, K., Sawano, A., Miyawaki, A. y Ikura, M. (2007): "Calcium indicators based on calmodulin-fluorescent protein fusions", *Methods Mol. Biol.*, 352, pp.71-82. PMID: 17041259
- Tseng, B.P., Green, K.N., Chan, J.L., Blurton-Jones, M. y LaFerla, F.M. (2008): "Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation", *Neurobiol. Aging*, 29(11), pp.1607-1618. PMID: 17544172
- Tsien, R.Y. (1980): "New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures", *Biochemistry*, 19(11), pp.2396-2404. PMID: 6770893
- Tuszynski, M.H., Thal, L., Pay, M., Salmon, D.P., U, H.S., Bakay, R., Patel, P., Blesch, A., Vahlsing, H.L., Ho, G., Tong, G., Potkin, S.G., Fallon, J., Hansen, L., Mufson, E.J., Kordower, J.H., Gall, C. y Conner, J. (2005): "A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease", *Nat. Med.*, 11(5), pp.551-555. PMID: 15852017
- Tuszynski, M.H. (2007): "Nerve growth factor gene therapy in Alzheimer disease", *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 21(2), pp.179-189. PMID: 17545746
- Unitt, J.F., Boden, K.L., Wallace, A.V., Ingall, A.H., Coombs, M.E. y Francis, I. (1999): "Novel cobalt complex inhibitors of mitochondrial calcium uptake", *Bioorg. Med. Chem.*, 7(9), pp.1891-1896. PMID: 10530937
- Valla, J., Yaari, R., Wolf, A.B., Kusne, Y., Beach, T.G., Roher, A.E., Corneveaux, J.J., Huentelman, M.J., Caselli, R.J. y Reiman, E.M. (2010): "Reduced posterior cingulate mitochondrial activity in expired young adult carriers of the APOE ϵ 4 allele, the major late-onset Alzheimer's susceptibility gene", *J. Alzheimers Dis.*, 22(1), pp.307-313. PMID: 20847408. doi: 10.3233/JAD-2010-100129
- Van Dyck, C.H., Tariot, P.N., Meyers, B. y Malca Resnick, E. (2007): "A 24-week randomized, controlled trial of memantine in patients with moderate-to-severe Alzheimer disease", *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 21(2), pp.136-143. PMID: 17545739
- Van Helmond, Z., Miners, J., Kehoe, P.G. y Love, S. (2010): "Oligomeric Abeta in Alzheimer's disease: Relationship of plaque and tangle pathology, APOE genotype and cerebral amyloid angiopathy", *Brain Pathol.*, 20(2), pp.468-480. PMID: 19725829. doi: 10.1111/j.1750-3639.2009.00321.x
- Vehmas, A.K., Kawas, C.H., Stewart, W.F. y Troncoso, J.C. (2003): "Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease", *Neurobiol. Aging*, 24(2), pp.321-331. PMID: 12498966
- Verbeek, M.M., de Waal, R.M., Schipper, J.J. y Van Nostrand, W.E. (1997): "Rapid degeneration of cultured human brain pericytes by amyloid beta protein", *J. Neurochem.*, 68(3), pp.1135-1141. PMID: 9048759

- Viana, R.J., Nunes, A.F. y Rodrigues, C.M. (2012): "Endoplasmic reticulum enrollment in Alzheimer's disease", *Mol. Neurobiol.*, 46(2), pp.522-534. PMID: 22815194. doi: 10.1007/s12035-012-8301-x
- Villalobos, C., Fonteriz, R., López, M.G., García, A.G. y García-Sancho, J. (1992): "Inhibition of voltage-gated Ca²⁺ entry into GH3 and chromaffin cells by imidazole antimycotics and other cytochrome P450 blockers", *FASEB J.*, 6(9), pp.2742-2747. PMID: 1319362
- Villalobos, C., Caballero, E., Sanz-Blasco, S. y Núñez L. (2012): " Study of neurotoxic intracellular calcium signalling triggered by amyloids", *Methods Mol. Biol.*, 849, pp.289-302. PMID: 22528098. doi: 10.1007/978-1-61779-551-0_20
- Virués-Ortega, J., De Pedro-Cuesta, J., Vega, S., Seijo-Martínez, M., Saz, P., Rodríguez, F., Rodríguez-Laso, A., Reñé, R., de Las Heras, S.P., Mateos, R., Martínez-Martín, P., Mahillo-Fernández, I., López-Pousa, S., Lobo, A., Reglà, J.L., Gascón, J., García, F.J., Fernández-Martínez, M., Boix, R., Bermejo-Pareja, F., Bergareche, A., Sánchez-Sánchez, F., de Arce, A. y del Barrio, J.L. (2011): "Prevalence and European comparison of dementia in a ≥75-year-old composite population in Spain", *Acta Neurol. Scand.*, 123(5), pp.316-324. PMID: 20636450. doi: 10.1111/j.1600-0404.2010.01398.x
- Vitolo, O.V., Sant'Angelo, A., Constanzo, V., Battaglia, F., Arancio, O. y Shelanski, M. (2002): "Amyloid β -peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(20), pp.13217-13221. PMID: 12244210
- Wang, J., Dickson, D.W., Trojanowski, J.Q. y Lee, V.M.Y. (1999): "The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging", *Exper. Neurol.*, 158(2), pp.328-337. PMID: 10415140
- Wang, X., Su, B., Siedlak, S.L., Moreira, P.I., Fujoka, H., Wang, Y., Casadeus, G. y Zhu, X. (2008): "Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(49), pp.19318-19323. PMID: 19050078. doi: 10.1073/pnas.0804871105
- Wang, Z., Yang, D., Zhang, X., Li, T., Li, J., Tang, Y. y Le, W. (2011): "Hypoxia-induced down-regulation of neprilysin by histone modification in mouse primary cortical and hippocampal neurons", *PloS One*, 6(4): e19229. PMID: 21559427. doi: 10.1371/journal.pone.0019229
- Ward, S.M., Himmelstein, D.S., Lancia, J.K. y Binder, L.I. (2012): "Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease", *Biochem. Soc. Trans.*, 40(4), pp.667-671. PMID: 22817713. doi: 10.1042/BST20120134
- Webster, S. J., Bachstetter, A.D., Nelson, P.T., Schmitt, F.A. y Van Eldik, L.J. (2014): "Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models", *Front. Gen.*, 5: 88. PMID: 24795750. doi: 10.3389/fgene.2014.0008
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T. y Delon, M.R. (1982): "Alzheimer's disease and senile dementia-loss of neurons in the basal forebrain", *Science*, 215(4537), pp.1237-1239. PMID: 7058341

- Whitehouse, P.J. (1993): "Cholinergic therapy in dementia", *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, 149, pp.42-45. PMID: 8128838
- Wiegert, J.S. y Bading, H. (2011): "Activity-dependent calcium signaling and ERK-MAP kinases in neurons: a link to structural plasticity of the nucleus and gene transcription regulation", *Cell Calcium*, 49(5), pp.296-305. PMID: 21163523. doi: 10.1016/j.ceca.2010.11.009
- Wojda, U., Salinska, E. y Kuznicki, J. (2008): "Calcium ions in neuronal degeneration", *IUBMB Life*, 60(9), pp.575-590. PMID: 18478527. doi: 10.1002/iub.91
- Wu, J., Peng, S., Wu, R., Hao, Y., Ji, G. y Yuan, Z. (2012): "Generation of Calhm1 knockout mouse and characterization of calhm1 gene expression", *Protein Cell*, 3(6), pp.470-480. PMID: 22723178. doi: 10.1007/s13238-012-2932-6
- Yang, E.J., Kim, G.S., Jun, M. y Song, K.S. (2014): "Kaempferol attenuates the glutamate-induced oxidative stress in mouse-derived hippocampal neuronal HT22 cells", *Food Funct.*, 5(7), pp.1395-1402. PMID: 24770605. doi: 10.1039/c4fo00068d
- Yoo, A. S., Cheng, I., Chung, S., Grenfell, T. Z., Lee, H., Pack- Chung, E., Handler, M., Shen, J., Xia, W., Tesco, G., Saunders, A. J., Ding, K., Frosch, M. P., Tanzi, R. E., y Kim, T. W. (2000): "Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry", *Neuron*, 27(3), pp.561-572. PMID: 11055438
- Yu, Y.H. y Ginsberg, H.N. (2005): "Adipocyte signaling and lipid homeostasis: Sequelae of insulin-resistant adipose tissue", *Circul. Res.*, 96(10), pp.1042-1052. PMID: 15920027
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I. y Thomson, J.A. (2007): "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells", *Science*, 318(5858): pp.1917-1920. PMID: 18029452
- Zabner, J., Fasbender, A.J., Moninger, T., Poellinger, K.A. y Welsh, M.J. (1995): "Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid", *J. Biol. Chem.*, 270(32), pp.18997-9007. PMID: 7642560
- Zampese, E., Fasolato, C., Kipanyula, M.J., Bortolozzi, M., Pozzan, T. y Pizzo, P. (2011): "Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria interactions and Ca²⁺ cross-talk", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(7), pp.2777-2782. PMID: 21285369. doi: 10.1073/pnas.1100735108
- Zatti, G., Ghidoni, R., Barbiero, L., Binetti, G., Pozzan, T., Fasolato, C. y Pizzo, P. (2004): "The presenilin 2 M239I mutation associated with familial Alzheimer's disease reduces Ca²⁺ release from intracellular stores", *Neurobiol. Dis.*, 15(2), pp.269-278. PMID: 15006697
- Zatti, G., Burgo, A., Giacomello, M., Barbiero, L., Ghidoni, R., Sinigaglia, G., Florean, C., Bagnoli, S., Binetti, G., Sorbi, S., Pizzo, P. y Fasolato, C. (2006): " Presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease reduce endoplasmic reticulum and Golgi apparatus calcium levels", *Cell Calcium*, 39(6), pp.539-550. PMID: 16620965
- Zhao, Z., Xiang, Z., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Stetka, B. y Pasinetti, G.M. (2007): "Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation

of cases at high risk to develop Alzheimer's disease", *Neurobiol. Aging*, 28(6), pp.824-830. PMID: 16769157

Recursos en la red

Alom Poveda, J., Baquero, M., Catalá, J., Díaz Marín, C., Escudero Torrella J., Martínez Lozano, M.D., Morera Guitart, J., Peset, J., Piqueras Rodríguez, L., Roig, S., Sánchez Roy, R. y Satonja, J.M., 2006: Plan de Asistencia Integral a los Pacientes con E. de Alzheimer y Otras Demencias (PAIDEM 2006 Comunidad Valenciana), *Sociedad Valenciana de Neurología*, Disponible en: <http://www.svneurologia.org/paidem.htm> (Consulta realizada el 14 de mayo de 2014)

Artículo original de Alois Alzheimer (1907) En http://de.wikiversity.org/wiki/Alzheimer,_Alois_%281906%29 (Consulta realizada el 13 de septiembre de 2014, con la colaboración del Servicio de Préstamo Interbibliotecario de la Biblioteca de la Universidad Autónoma de Madrid)

Ensayo Clínico "Effect of LY450139 on the Long Term Progression of Alzheimer's Disease" En <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00594568?intr=ly+450139&rank=1> (Consulta realizada el 18 de agosto de 2014)

Ensayos Clínicos en curso para la enfermedad de Alzheimer En <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Alzheimer+Disease> (Consulta realizada el 12 de Julio de 2014)

Información sobre el gen y la proteína CALHM1 En <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CALHM1> (Consulta realizada el 6 de octubre de 2014)

Información sobre kit de determinación de caspasas-3/-7 En http://www.promega.es/products/cell-health-and-metabolism/apoptosis-assays/luminescent-caspase-assays/caspase_glo-3_7-assay-systems/?activeTab=0 (Consulta realizada el 10 de mayo de 2014)

Información sobre Mycoplasma: "Background on Mycoplasma contamination" En <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/cell-culture-products/mycoplasma-detection-and-removal/background-on-mycoplasma-contamination.aspx> (Consulta realizada el 3 de junio de 2014)

Fuente de las imágenes obtenidas en la Red (por orden de aparición)

<http://www.cuhk.edu.hk/med/paf/slides/neuropat/x-22.htm>
(Consulta realizada el 1 de mayo de 2014)

<https://wiki.brown.edu/confluence/display/BN0193S04/Schenk+et+al>
(Consulta realizada el 1 de mayo de 2014)

<http://www.studyblue.com/notes/n/pathology-/deck/114139>
(Consulta realizada el 1 de mayo de 2014)

<http://www.mayo.edu/research/labs/alzheimers-disease-inflammation/overview>

(Consulta realizada el 1 de mayo de 2014)

<http://marciocandiani.site.med.br/index.asp?PageName=Dem-EAncias>

(Consulta realizada el 1 de mayo de 2014)

<http://users.loni.usc.edu/~thompson/MEDIA/USNEWS/brainscansLARGE.jpg>

(Consulta realizada el 1 de mayo de 2014)

<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Alzheimer+Disease>

(Consulta realizada el 12 de julio de 2014)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

(Consulta realizada el 11 de agosto de 2014)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=%28calhm1\[gene\]%29%20AND%20%28Homo%20sapiens\[orgn\]%29%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=%28calhm1[gene]%29%20AND%20%28Homo%20sapiens[orgn]%29%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight)

(Consulta realizada el 16 de agosto de 2014)

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/illpres.html?print=1

(Consulta realizada el 13 de abril de 2014)

<http://www.bu.edu/today/2008/bu-prof-wins-nobel-prize-in-chemistry/>

(Consulta realizada el 13 de abril de 2014)

<http://www.openoptogenetics.org/index.php?title=File:Aequorin.png>

(Consulta realizada el 13 de abril de 2014)

http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/203024/leccin_422_transfeccin.html

(Consulta realizada el 13 de abril de 2014)

http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay

(Consulta realizada el 24 de abril de 2014)

<http://www.symposcium.com/2013/07/qa-what-is-the-difference-between-apoptosis-and-necrosis/>

(Consulta realizada el 2 de mayo de 2014)

<http://cajalesygalileos.wordpress.com/2012/11/29/los-eucariotas-y-el-ciclo-celular-scitable/>

(Consulta realizada el 2 de mayo de 2014)

http://www.promega.es/products/cell-health-and-metabolism/apoptosis-assays/luminescent-caspase-assays/caspase_glo-3_7-assay-systems/?activeTab=0

(Consulta realizada el 2 de mayo de 2014)

<http://www.virology.ws/2010/07/07/virology-toolbox-the-western-blot/>

(Consulta realizada el 8 de mayo de 2014)

http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/capitulo6_7.htm

(Consulta realizada el 8 de mayo de 2014)

Anexo I: LISTADO COMPLETO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

(por orden de aparición, indicado con el subíndice)

- ¹ **EA**: Enfermedad de Alzheimer
- ² **NMDA**: N-Metil-D-Aspartato
- ³ **P86L-CALHM1**: Polimorfismo del canal "CALcium Homeostasis Modulator 1", consistente en la sustitución de una Prolina por una Leucina en el codón 86
- ⁴ **APOE ε3**: Isoforma ε3 de la apolipoproteína E
- ⁵ **βA**: Péptido β-amiloide
- ⁶ **βA₁₋₄₀**: Péptido β-amiloide formado por 40 aminoácidos
- ⁷ **βA₁₋₄₂**: Péptido β-amiloide formado por 42 aminoácidos
- ⁸ **APOs**: Apolipoproteínas
- ⁹ **APP**: Proteína precursora del péptido β-amiloide
- ¹⁰ **BACE1**: Acrónimo inglés "β-site APP cleaving enzyme 1" que alude a la β-secretasa
- ¹¹ **IDE**: Acrónimo inglés "insuline-degrading enzyme" que designa a la enzima degradadora de insulina
- ¹² **ECes**: Enzimas convertidoras de endotelina
- ¹³ **MMPs**: Acrónimo inglés "matrix metalloproteinases" que alude a las metaloproteasas de matriz
- ¹⁴ **BHE**: Barrera hematoencefalica
- ¹⁵ **RAGE**: Acrónimo inglés del receptor para productos finales de glicación avanzada "Receptor for Advanced Glycation End-products"
- ¹⁶ **LDL**: Del inglés, "Low-Density Lipoproteins", lipoproteínas de baja densidad
- ¹⁷ **LRP**: Del inglés "LDL receptor Related Protein", designa a la proteína relacionada con el receptor de LDL
- ¹⁸ **RE**: Retículo endoplásmico
- ¹⁹ **MAP**: Proteína asociada a microtúbulos
- ²⁰ **APOE**: Apolipoproteína E
- ²¹ **PDPK**: Proteína cinasa de serina y treonina dirigida por prolina, del inglés inglés "proline directed serin/threonin protein-kinase"

- ²² **MAPKs**: Proteínas cinasas activadas por mitógenos, del inglés "mitogen-activated protein-kinase"
- ²³ **GSK3 β** : Proteína cinasa de la sintasa de glucógeno 3 β , del inglés "glucogene synthase kinase 3 β "
- ²⁴ **PKA**: Proteína cinasa dependiente de AMP cíclico
- ²⁵ **CAMK11**: Proteína cinasa II dependiente de Ca²⁺-calmodulina, del inglés "Ca²⁺-calmoduline kinase II"
- ²⁶ **PP**: Fosfoproteínas fosfatasas
- ²⁷ **LCR**: Líquido cefalorraquídeo
- ²⁸ **Caspasas**: Original acrónimo de cisteinil-aspartato proteasas
- ²⁹ **iNOS**: Sintasa inducible de óxido nítrico, proveniente del inglés "inducible nitric oxyde synthase"
- ³⁰ **SOD**: Superóxido dismutasa
- ³¹ **NRF**: Acrónimo inglés de "nuclear respiratory factor" que alude al factor nuclear respiratorio
- ³² **PGC-1 α** : Coactivador 1 α del PPAR γ
- ³³ **HIF1 α** : Del inglés ("hypoxia inducible factor 1 α "), factor 1 α inducible por hipoxia
- ³⁴ **IP₃**: Inositol 1,4,5-trisfosfato
- ³⁵ **cADP**: Ribosa cíclica de adenosín difosfato, del inglés "cyclic adenosin diphosphate"
- ³⁶ **NAADP**: Ácido de dinucleótido de nicotina y adenina fosfato, procedente del inglés "nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate"
- ³⁷ **SERCA**: Acrónimo inglés "(sarco)-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase" que alude a la ATPasa de Ca²⁺ del retículo endoplásmico
- ³⁸ **PMCA**: Acrónimo inglés "plasma membrane Ca²⁺ ATPase" que alude a la bomba de Ca²⁺ de la membrana plasmática
- ³⁹ **mpNCX**: Intercambiador Na⁺/Ca²⁺ de la membrana plasmática
- ⁴⁰ **VDAC**: Acrónimo inglés "voltage dependent anion channel" que define al canal aniónico dependiente de voltaje
- ⁴¹ **mUP**: Acrónimo inglés "mitochondrial uniporter" que alude al uniportador mitocondrial de Ca²⁺
- ⁴² **mNCX**: Intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial

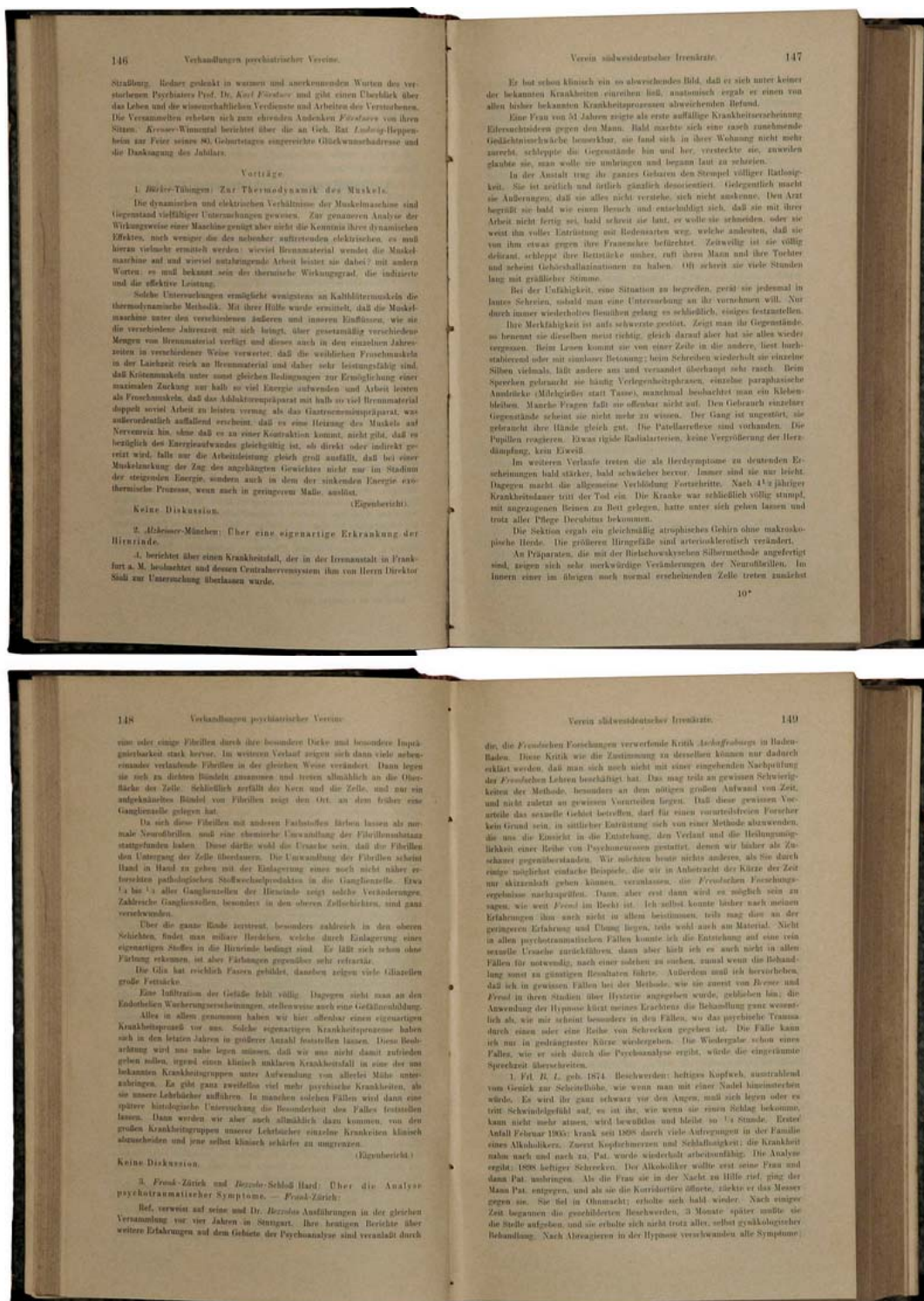
- ⁴³ **mPTP**: Del inglés "mitochondrial permeability transition pore", alude al poro mitocondrial de permeabilidad transitoria
- ⁴⁴ **Opa1**: Acrónimo inglés de "optic atrophy 1", pues su delección conlleva una atrofia óptica severa
- ⁴⁵ **Mfn**: Mitofusina, del inglés "Mitofusin1"
- ⁴⁶ **MAMs**: Membranas asociadas a mitocondrias
- ⁴⁷ **[Ca²⁺]_{cit}**: Concentración citosólica de Ca²⁺
- ⁴⁸ **RIP₃s**: Receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato
- ⁴⁹ **RRi**: Receptores de rianodina
- ⁵⁰ **RL**: Radicales libres
- ⁵¹ **CALHM1**: Acrónimo inglés de "CALcium Homeostasis Modulator 1" que designa al modulador 1 de la homeostasia del Ca²⁺
- ⁵² **AChE**: Acetilcolinesterasa
- ⁵³ **ACh**: Acetilcolina
- ⁵⁴ **APOE ε4**: Isoforma ε4 de la Apolipoproteína E
- ⁵⁵ **CLU**: Clusterina o apolipoproteína J
- ⁵⁶ **SORL1**: Acrónimo inglés "sortilin-related receptor 1", es decir, receptor 1 relacionado con la sortilina
- ⁵⁷ **ABCA7**: Del inglés "ATP-binding cassette, subfamily A, member 7"
- ⁵⁸ **PICALM**: Acrónimo inglés "phosphatidylinositol binding clathrin assembly", que hace referencia a la proteína de ensamblaje de la clatrina que se une al fosfatidilinositol
- ⁵⁹ **BIN1**: Acrónimo inglés "bridging integrator1"
- ⁶⁰ **EXOC3L2**: Del inglés "exocyst complex component 3-like2"
- ⁶¹ **TREM2**: Acrónimo inglés "triggering receptor expressed on myeloid cells 2" que designa al receptor activador 2 expresado en las células mieloides
- ⁶² **miRNAs**: microARNs, secuencias no codificadoras del ácido ribonucleico
- ⁶³ **ANK1**: Anquirina 1, del inglés "ankyrin 1"
- ⁶⁴ **ORF**: "Open Reading Frame", región génica de lectura abierta
- ⁶⁵ **TM**: Transmembranal (domino)
- ⁶⁶ ***C. elegans***: Nematodo *Caenorhabditis elegans* (Maupas)
- ⁶⁷ **SH-SY5Y**: Línea celular de neuroblastoma humana
- ⁶⁸ ***Xenopus***: Rana africana de uñas *Xenopus laevis* (Daudin)

- ⁶⁹ **GFP**: Acrónimo inglés "Green Fluorescent Protein" que define a la proteína fluorescente verde
- ⁷⁰ **CHLM-1**: Homólogo de CALHM1 en *C. elegans*
- ⁷¹ **CHO**: Acrónimo inglés de "Chinese Hamster Ovary" que designa a la línea celular no excitable procedente de ovario de hámster chino
- ⁷² **N2a**: Línea celular de neuroblastoma de ratón
- ⁷³ **P**: Permeabilidad
- ⁷⁴ **[Ca²⁺]**: Concentración de Ca²⁺
- ⁷⁵ **HT22**: Línea celular de hipocampo de ratón
- ⁷⁶ **PC12**: Línea celular de feocromocitoma de rata
- ⁷⁷ **HEK-293**: Línea celular de riñón de embrión humano
- ⁷⁸ **HeLa**: Línea celular no excitable procedente de un carcinoma de cérvix de la Sra. Henrietta Lacks
- ⁷⁹ **CCDV**: Canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje
- ⁸⁰ **TRPM5**: Acrónimo inglés de "Transient Receptor Potential cation channel subfamily M member 5", es decir, un canal de cationes dependiente de transientes de Ca²⁺
- ⁸¹ **Cos1**: Línea celular cuyo acrónimo inglés es "CV-1 (simio) in Origin and carrying the SV40 genetic material 1")
- ⁸² **GPCR**: Receptor de membrana acoplado a proteína
- ⁸³ **2-APB**: Borato de 2-aminoetoxidifenilo (del inglés "2-AminoethoxydiPhenyl Borate")
- ⁸⁴ **TTX**: Tetrodotoxina
- ⁸⁵ **TEA**: Trietilamina
- ⁸⁶ **TRP**: Acrónimo inglés de "Transient Receptor Potential"
- ⁸⁷ **KO**: Knock out, ratón deleciónado para un gen
- ⁸⁸ **iPSc**: Acrónimo inglés "induced pluripotent stem-cell", que define a las células troncales pluripotentes reprogramadas
- ⁸⁹ **DMEM**: Del inglés ("Dulbecco's modified Eagle medium"), medio de Eagle modificado por Dulbecco
- ⁹⁰ **SBF**: Suero bovino fetal inmunológicamente inactivado por calor
- ⁹¹ **PBS**: Solución tampón fosfato
- ⁹² **EDTA**: Ácido etiléndiaminotetraacético

- ⁹³ **DMSO**: Dimetilsulfóxido
- ⁹⁴ **PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa, del acrónimo inglés "Polymerase Chain Reaction"
- ⁹⁵ **DAPI**: Dihidrocloruro de 4',6-diamidino-2-fenilindol
- ⁹⁶ **[Ca²⁺]_{mit}**: Concentración de Ca²⁺ en la matriz mitocondrial
- ⁹⁷ **[Ca²⁺]_{nuc}**: Concentración de Ca²⁺ en el nucleoplasma
- ⁹⁸ **AEQ**: Ecuorina
- ⁹⁹ **[Sr²⁺]**: Concentración de Sr²⁺
- ¹⁰⁰ **ADNc**: ADN copia
- ¹⁰¹ **Apo-AEQ**: Apoecuorina
- ¹⁰² **COX VIII**: subunidad VIII de la citocromo C oxidasa
- ¹⁰³ **AEQ-mitmut**: ecuorina mutada dirigida genéticamente a la mitocondria
- ¹⁰⁴ **HEPES**: N-[2-hidroxietil]-piperacino-N'-[2-ácido etanosulfónico]
- ¹⁰⁵ **EGTA**: Ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
- ¹⁰⁶ **FCCP**: Carbonil cianida-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona
- ¹⁰⁷ **βA₂₅₋₃₅**: Fragmento tóxico 35-35 del péptido β-amiloide
- ¹⁰⁸ **cpGFP**: Proteína verde fluorescente con tecnología de permutación circular
- ¹⁰⁹ **mtAlpHi**: Indiciador del pH de la matriz mitocondrial (del inglés, "mitochondrial alkaline pH indicator")
- ¹¹⁰ **YFP**: proteína fluorescente amarilla
- ¹¹¹ **mtECFP**: Proteína fluorescente ciano dirigida a mitocondria
- ¹¹² **MTT**: Sal de metiltetrazolio
- ¹¹³ **PAO**: Óxido de fenilarsina
- ¹¹⁴ **IP**: yoduro de propidio
- ¹¹⁵ **Anexina V-FITC**: Anexina V acoplada a un fluoróforo verde
- ¹¹⁶ **Anti-p-ERK**: Anticuerpo contra la forma fosforilada de ERK
- ¹¹⁷ **Anti-t-ERK**: Anticuerpo contra ERK total
- ¹¹⁸ **Anti-p-CREB**: Anticuerpo contra la forma fosforilada de CREB
- ¹¹⁹ **Anti-t-CREB**: Anticuerpo contra CREB total
- ¹²⁰ **RE-GFP**: Proteína fluorescente verde dirigida a retículo endoplásmico
- ¹²¹ **mit-RFP**: Proteína fluorescente roja dirigida a mitocondria
- ¹²² **ANOVA**: Análisis de la varianza
- ¹²³ **ABC**: Área bajo la curva, concentración total de Ca²⁺ por unidad de tiempo

- ¹²⁴ τ_{act} : Constante de tiempo de activación
- ¹²⁵ τ_{inact} : Constante de tiempo de inactivación
- ¹²⁶ **ITH33**: ITH12233
- ¹²⁷ Ψ_{mit} : Potencial de membrana mitocondrial
- ¹²⁸ **DE₅₀**: Dosis efectiva 50
- ¹²⁹ **UAF**: Unidades arbitrarias de fluorescencia
- ¹³⁰ **CREB**: Del inglés (cAMP-response element binding protein), proteína de respuesta a la unión del AMPc
- ¹³¹ **ERK**: Del inglés, "Extracellular Regulated Kinases", son las proteínas cinasas reguladas extracelularmente
- ¹³² **MSK1/2**: Acrónimo inglés de "Mitogen- and Stress-activated Kinase" que designa a las cinasas 1/2 activadas por mitógeno y estrés
- ¹³³ **MEK1/2**: Cinasas 1/2 de la proteína cinasa de especificidad dual activada por mitógenos (del inglés "dual specifity Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2")
- ¹³⁴ **RSK1/2/3**: Proteína scinasas 1-3 de la subunidad S6 ribosomal de 90 kDa
- ¹³⁵ **GTPasa**: Hidrolasa de trifosfato de guanidilo
- ¹³⁶ **BAPTA-AM**: (Acetoximetil)éster del ácido tetrakis 1,2-bis(2-amino-5metilfenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético
- ¹³⁷ **MAPK**: Del inglés mitogen-activated protein kinase, es decir, proteína cinasa activada por mitógenos

ANEXO II: ARTÍCULO ORIGINAL DE ALOIS ALZHEIMER DESCRIBIENDO LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER



Anexo II.- Fotografías del libro de Actas de la reunión de psiquiatras en la que Alois Alzheimer presentó públicamente la enfermedad epónima. Advuértase al final del resumen el comentario "Keine Diskussion", que alude al escaso éxito científico que obtuvo.
Fuente: http://de.wikiversity.org/wiki/Alzheimer,_Alois_%281906%29, con la colaboración del Servicio de Préstamo Interbibliotecario de la Biblioteca de la Universidad Autónoma de Madrid